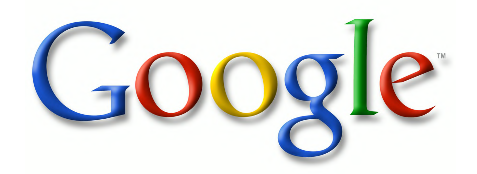


Über dieses Buch

Dies ist ein digitales Exemplar eines Buches, das seit Generationen in den Regalen der Bibliotheken aufbewahrt wurde, bevor es von Google im Rahmen eines Projekts, mit dem die Bücher dieser Welt online verfügbar gemacht werden sollen, sorgfältig gescannt wurde.

Das Buch hat das Urheberrecht überdauert und kann nun öffentlich zugänglich gemacht werden. Ein öffentlich zugängliches Buch ist ein Buch, das niemals Urheberrechten unterlag oder bei dem die Schutzfrist des Urheberrechts abgelaufen ist. Ob ein Buch öffentlich zugänglich ist, kann von Land zu Land unterschiedlich sein. Öffentlich zugängliche Bücher sind unser Tor zur Vergangenheit und stellen ein geschichtliches, kulturelles und wissenschaftliches Vermögen dar, das häufig nur schwierig zu entdecken ist.

Gebrauchsspuren, Anmerkungen und andere Randbemerkungen, die im Originalband enthalten sind, finden sich auch in dieser Datei – eine Erinnerung an die lange Reise, die das Buch vom Verleger zu einer Bibliothek und weiter zu Ihnen hinter sich gebracht hat.

Nutzungsrichtlinien

Google ist stolz, mit Bibliotheken in partnerschaftlicher Zusammenarbeit öffentlich zugängliches Material zu digitalisieren und einer breiten Masse zugänglich zu machen. Öffentlich zugängliche Bücher gehören der Öffentlichkeit, und wir sind nur ihre Hüter. Nichtsdestotrotz ist diese Arbeit kostspielig. Um diese Ressource weiterhin zur Verfügung stellen zu können, haben wir Schritte unternommen, um den Missbrauch durch kommerzielle Parteien zu verhindern. Dazu gehören technische Einschränkungen für automatisierte Abfragen.

Wir bitten Sie um Einhaltung folgender Richtlinien:

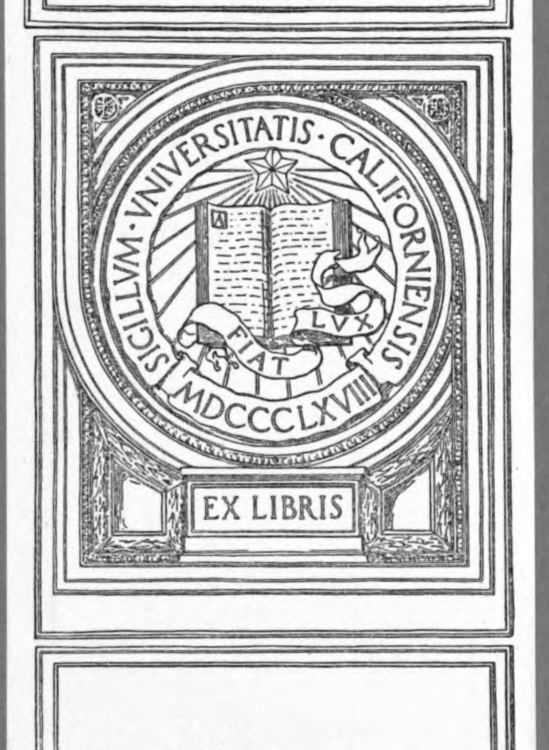
+ *Nutzung der Dateien zu nichtkommerziellen Zwecken* Wir haben Google Buchsuche für Endanwender konzipiert und möchten, dass Sie diese Dateien nur für persönliche, nichtkommerzielle Zwecke verwenden.
+ *Keine automatisierten Abfragen* Senden Sie keine automatisierten Abfragen irgendwelcher Art an das Google-System. Wenn Sie Recherchen über maschinelle Übersetzung, optische Zeichenerkennung oder andere Bereiche durchführen, in denen der Zugang zu Text in großen Mengen nützlich ist, wenden Sie sich bitte an uns. Wir fördern die Nutzung des öffentlich zugänglichen Materials für diese Zwecke und können Ihnen unter Umständen helfen.
+ *Beibehaltung von Google-Markenelementen* Das "Wasserzeichen" von Google, das Sie in jeder Datei finden, ist wichtig zur Information über dieses Projekt und hilft den Anwendern weiteres Material über Google Buchsuche zu finden. Bitte entfernen Sie das Wasserzeichen nicht.
+ *Bewegen Sie sich innerhalb der Legalität* Unabhängig von Ihrem Verwendungszweck müssen Sie sich Ihrer Verantwortung bewusst sein, sicherzustellen, dass Ihre Nutzung legal ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass ein Buch, das nach unserem Dafürhalten für Nutzer in den USA öffentlich zugänglich ist, auch für Nutzer in anderen Ländern öffentlich zugänglich ist. Ob ein Buch noch dem Urheberrecht unterliegt, ist von Land zu Land verschieden. Wir können keine Beratung leisten, ob eine bestimmte Nutzung eines bestimmten Buches gesetzlich zulässig ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass das Erscheinen eines Buchs in Google Buchsuche bedeutet, dass es in jeder Form und überall auf der Welt verwendet werden kann. Eine Urheberrechtsverletzung kann schwerwiegende Folgen haben.

Über Google Buchsuche

Das Ziel von Google besteht darin, die weltweiten Informationen zu organisieren und allgemein nutzbar und zugänglich zu machen. Google Buchsuche hilft Lesern dabei, die Bücher dieser Welt zu entdecken, und unterstützt Autoren und Verleger dabei, neue Zielgruppen zu erreichen. Den gesamten Buchtext können Sie im Internet unter `http://books.google.com` durchsuchen.

B 3 778 043

Digitized by Google




Digitized by Google



Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Biochemische Zeitschrift

Beiträge
zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, C. von Noorden-Frankfurt a. M.,
E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin

unter Mitwirkung von

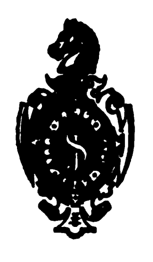
M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durig-Wien, P. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, J. Feigl-Hamburg, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin-Dahlem, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, F. Haber-Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger-Groningen, P. Hári-Budapest, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, A. Koch-Göttingen, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Greifswald, L. Michaelis-Berlin, H. Molisch-Wien, J. Morgenroth-Berlin, E. Münzer-Prag, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, P. Rona-Berlin, S. Saaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, P. Trendelenburg-Rostock, O. Warburg-Berlin, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertundfünfter Band

Manulnachdruck



Berlin
Verlag von Julius Springer
1920

Digitized by Google

Digitized by Google

Inhaltsverzeichnis.



Digitized by Google

Max Siegfried †.

7. April 1864—22. Februar 1920.

Siegfried, der in den Jahren 1883—87 in seiner Vaterstadt Leipzig und München Chemie studierte und 1887 zum Dr. phil. promovierte, trat nach kurzer Tätigkeit bei den Höchster Farbwerken 1888 als Assistent in die von Drechsel geleitete chemische Abteilung des Leipziger physiologischen Institutes ein. Nachdem er im Jahre 1892 sich in der philosophischen Fakultät habilitiert hatte, wurde er 1897 außerordentlicher Professor in der medizinischen Fakultät, die ihn 1910 mit der Würde eines Dr. med. honoris causa auszeichnete. Bei dem Wechsel in der Leitung des Leipziger physiologischen Instituts im Jahre 1916 erfolgte eine Teilung der Physiologie in allgemeine und chemische Physiologie. Für letztere wurde ein eigenes Institut errichtet, das Siegfried zunächst als ord. Honorarprofessor und später als Ordinarius übernahm.

Dieser Anerkennung seiner Leistungen und seines Faches hat Siegfried sich jedoch nicht lange erfreuen dürfen. Ende des Jahres 1918 erlitt er einen schweren seelischen Zusammenbruch, den der Schmerz um den Heldentod zweier hoffnungsvoller Söhne im Weltkriege ausgelöst hat. Er mußte seine Tätigkeit unterbrechen, sein Zustand schwankte, bis er im Februar ds. Js. von seinen Leiden erlöst wurde.

Siegfried hat durch zahlreiche Arbeiten das Gebiet der physiologischen Chemie in hervorragender Weise gefördert. Seine erste Veröffentlichung aus dem Jahre 1889 betrifft eine Untersuchung der Milchsäure im Muskelsaft und die künstliche Darstellung der Acetyl-

Digitized by Google

milchsäure. Der Untersuchung der Extraktivstoffe des Muskels hat er zahlreiche Untersuchungen gewidmet, die zur Auffindung der interessanten Phosphorfleischsäure führten, einer komplizierten Verbindung, welche als Spaltungsprodukte eine peptonartige Substanz, Phosphorsäure, ein Kohlenhydrat, Milchsäure sowie Bernsteinsäure lieferte. Die Substanz gehört zur Gruppe der Nukleone, deren Vertreter Siegfried auch in der Milch antraf. Seine weiteren Mitteilungen behandeln vielfach die Lehre von der Verdauung sowie die künstliche Spaltung von Eiweißkörpern. Er wurde der Entdecker gut definierter Produkte bei der partiellen Eiweißhydrolyse, die er mit den Namen Kyrine bezeichnete. Es handelt sich hierbei im wesentlichen um Produkte, die ihrer Molekulargröße nach zwischen den einfachen Peptiden und höheren Peptonen stehen und durch das Krystallisationsvermögen ihrer Salze ausgezeichnet sind. Eine zusammenfassende Darstellung dieses Gebietes hat Siegfried in der Kanitzschen Sammlung mit einer wertvollen Monographie (1916) geliefert. Von größtem physiologischen Interesse war seine Entdeckung, daß die Kohlensäure sich an amphotere Aminokörper, insbesondere an Aminosäuren und ihre höheren Molekülverbände, anlagern kann (Carbamino-Reaktion). Er zeigte weiter, daß Alkohole, Zucker und Oxysäuren gleichfalls zu einer Addition von Kohlensäure befähigt sind, und daß bei dieser Reaktion die Kohlensäure öfter sich durch Schwefelkohlenstoff ersetzen läßt.

Auch durch eine Reihe analytischer wertvoller Arbeiten und Spezialuntersuchungen hat der Heimgegangene das Gebiet der Biochemie bereichert. Dieser Wissenszweig erleidet durch Siegfrieds frühen Tod einen schweren Verlust.

C. N.

Digitized by Google

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

42. Mitteilung.

Von

Leon Asher.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

Untersuchungen über die Funktion der Thymus und der Schilddrüse, geprüft am Verhalten des respiratorischen Stoffwechsels bei normaler und erhöhter Außentemperatur.

Von

Ernst Ruchti.

(Eingegangen am 31. Januar 1920.)

Mit 22 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Untersuchungen von Danoff[1]) im Asherschen Institut über den Einfluß der Milz auf den respiratorischen Stoffwechsel hatten Hauri veranlaßt, dessen Resultate beim Kaninchen nachzuprüfen. Die Ergebnisse beider Arbeiten waren die gleichen, nämlich, daß das Vorhandensein der Milz den respiratorischen Stoffwechsel hemmt, ihre Wegnahme ihn fördert.

Als neuen Gesichtspunkt hat Hauri den Einfluß der Schilddrüse in bezug auf Kohlensäure und Wasserausscheidung mit in den Kreis seiner Untersuchungen einbezogen, und als weiteren wichtigen Faktor die Versuche bei normaler und erhöhter Außentemperatur vorgenommen.

Die Resultate von Hauri gipfelten darin, daß thyreoidektomierte Kaninchen auf zwei Arten reagieren:

1. „In einer ersten Periode zeigt sich bei normaler Außentemperatur (bei 20° C) eine Steigerung der Kohlensäure- und Wasserabgabe. Gleichzeitig tritt eine auffallende Veränderung der Respiration bei erhöhter Außentemperatur zutage. Die Hitzepolypnöe fällt vollkommen weg. Die Wasserabgabe sinkt enorm, die Kohlensäureauscheidung ist ganz gering erhöht.

Digitized by Google

2. Die unter 1. charakterisierte Periode zeigt sich gar nicht oder klingt ab und geht in eine zweite über, wo Kohlensäure und Wasserausscheidung bei normaler Außentemperatur herabgesetzt sind. Bei erhöhter Außentemperatur aber besteht wieder deutlich Hitzepolypnöe, und trotzdem sind sowohl Wasser- wie Kohlensäureausscheidung vermindert."

Das unter 1. angeführte Verhalten sieht Hauri als den Ausdruck einer gestörten Wärmeregulation nach Thyreoidektomie an, wie sie übrigens an Hand von Rectaltemperaturmessungen bei Hund und Katze von Boldyreff[3]) nachgewiesen worden war.

Diese Ergebnisse waren an zwei thyreoidektomierten Tieren gesammelt worden. Gerade weil Kaninchen nach Thyreoidektomie auf zwei Arten reagierten, war es gegeben, die Befunde einer Nachprüfung zu unterziehen.

Von Herrn Prof. Asher auf diese Untersuchungen aufmerksam gemacht, habe ich es unternommen, unter seiner Leitung die Haurischen Resultate zu überprüfen, und, wenn möglich sie zu erweitern. Spezielles Augenmerk sollte dabei auf die Respiration, im besonderen bei erhöhter Außentemperatur gelegt werden. Neu sollte die Thymus einmal für sich allein, dann aber auch kombiniert mit Schilddrüsenexstirpation in den Kreis der Untersuchungen einbezogen werden. Nur gestützt auf die vollständig neue Untersuchungsmethode der veränderten, d. h. der erhöhten Außentemperatur, die bereits bei ihrer ersten Anwendung ein so bemerkenswertes Resultat geliefert und ein großes und wichtiges Arbeitsfeld eröffnet hat, durfte an dieses Organ herangegangen werden. Die Tatsache der geringen Reaktion von Kaninchen auf solche chirurgische Eingriffe bestand nach wie vor, in Hinblick auf obige Methode war aber möglicherweise ein neues Ergebnis zu erwarten.

Über die Thymusdrüse fehlen Stoffwechseluntersuchungen mit bezug auf Kohlensäure- und Wasserabgabe sozusagen überhaupt. Eine einzige diesbezügliche Angabe findet sich bei Friedleben[4]) (1858), der neben vermehrter Stickstoffausscheidung bei ekthymierten Hunden eine Verminderung der durch die Lungen ausgeschiedenen Kohlensäure nachgewiesen zu haben glaubt. Die übrigen zahlreichen Arbeiten, die bis dahin über Thymusfunktionen veröffentlicht wurden, und in dem zusammenfassenden Referat von Matti[5]), auf das ich verweise, näher besprochen

Digitized by Google

werden, beziehen sich im wesentlichen auf die Beobachtung thymopriver Allgemeinsymptome, auf Veränderungen am Knochensystem, auf Beziehungen zum Nervensystem, Kalkstoffwechsel, Blutbildung und in weitgehendem Maße auch auf Organkorrelationen. Die speziell in dieser Richtung sich sehr widersprechenden Angaben lassen vorläufig noch kein abschließendes Urteil zu.

Ganz besonders nachdrücklich aber wird von vielen Autoren ein weitgehender funktioneller Konnex von Thymus und Thyreoidea betont, und kein geringerer als Basch[6]) zieht aus seinen Arbeiten den allgemeinen Schluß, daß sich die Thymus am nächsten der Tätigkeit der Schilddrüse anschließt, mit der sie der Gruppe der branchiogenen Organe angehört.

Bei diesem Stand der Dinge lag es daher nahe, die Ausfallserscheinungen nach Thymektomie im Verein mit Thyreoideaausschaltung zu prüfen. Nach all den vielen „negativ ausgefallenen Thymusarbeiten" aber zu schließen, durfte man von vornherein nicht auf große frappante Unterschiede in der Kohlensäure und Wasserausscheidung nach Thymektomie rechnen, indem ein vikariierendes Eintreten verwandter Organe eben wahrscheinlich war. Ein Resultat nach Thyreo-Thymektomie, d. h. nach Entfernung zweier vorläufig als gleichsinnig wirkend angenommener Organe, war also um so eher zu erwarten.

Apparatur und Methode.

Ein zuverlässiges Verfahren, die Methode von Haldane[7]), erlaubt uns den respiratorischen Stoffwechsel beim Kaninchen zu bestimmen. Sie besteht im Prinzip darin, durch vorgelegte Schwefelsäure und Natronkalk in eine gedichtete Respirationskammer eintretende Luft wasser- resp. kohlensäurefrei zu machen. In der Kammer mischt sich mit dieser Luft das vom Kaninchen ausgeatmete Wasser und die Kohlensäure; sie passiert dann wiederum mit Schwefelsäure resp. Natronkalk gefüllte Flaschen, deren Gewichtszunahme das ausgeatmete Wasser resp. die Kohlensäure darstellt.

Das Prinzip dieser Methode hatte Hauri übernommen, die ganze Anordnung aber so ausgebaut, daß er die Temperatur in der Respirationskammer beliebig ändern und konstant erhalten konnte. Prüfung, Zuverlässigkeit und die genauen Maße der Apparatur sind in seiner Arbeit festgelegt, so daß ich mich hier kurz fassen kann und nur soweit auf Methode und Apparatur einzutreten brauche, als es für das Verständnis der Arbeit notwendig ist; einzig von mir angebrachte Abänderungen sollen genaue Beschreibung finden.

Digitized by Google

Am Anfang des Systems steht zur Mengenbestimmung der durchgesaugten Luft eine gewöhnliche trockene Gasuhr. Wenn diese Art der Luftmessung auch nicht sehr genau ist, so ist sie doch genügend. Auf die Gasuhr folgt eine Schwefelsäureflasche und eine Natronkalkflasche, wo der atmosphärischen Luft der Wasserdampf und die Kohlensäure entzogen wird. In einer weiteren, Schwefelsäure enthaltenden Flasche wird das bei der Bindung der Kohlensäure freiwerdende und bei eventuell feuchtem Natronkalk mitgerissene Wasser zurückgehalten. Die Luft tritt also wasser- und kohlensäurefrei in die Respirationskammer, die von einer Plethysmographenröhre gebildet wird. Den Verschluß am Eingang in das 12 cm weite Rohr habe ich abgeändert. Er war ursprünglich nach dem, von der Firma Stoppani & Cie in Bern nach Angaben von Prof. Asher konstruierten Respirationskasten für Ratten, wo er sich auch tadellos bewährte, hergestellt. Es zeigte sich aber bei den Dichtungsprüfungen der Apparatur, daß ein absoluter Verschluß zwischen Holzrahmen und Plethysmographenröhre mit Siegellack äußerst schwer zu erreichen und zudem unzuverlässig war.

Der neue Verschluß besteht einmal in einem festeren Holzrahmen, der ermöglichen soll, die Verschlußschrauben besser anzuziehen. Das wesentliche ist aber, daß der dickwandige und zudem an seiner Öffnung noch verbreiterte Zylinder bündig ist zum Holzrahmen, damit der 5 cm breite aus bestem, weichem Gummi geschnittene Ring ähnlich wie bei einem Konservenglas sowohl dem Zylinderrand als auch dem Holzrahmen anliegt.

Im weiteren wurde 10 cm vor der Ausgangsöffnung aus der Respirationskammer ein Drahtgitter eingeschoben. Auf diese Notwendigkeit wurde ich durch die Beobachtung geführt, daß oft aus zunächst unaufklärbaren Gründen das Thermometer, das die Temperatur in der Respirationskammer angibt, plötzlich in die Höhe stieg. Es war das immer dann der Fall, wenn das Kaninchen vorn in der Röhre saß und seine Ausatmungsluft das Thermometer direkt traf, oder wenn es gar anfing, das Thermometer zu belecken.

Soweit die Abänderungen; das übrige der Apparatur, der Heizkasten und die Absorptionsflaschen sind direkt von Hauri übernommen und ich verweise auf die genauen Angaben in seiner Arbeit.

Die Luft passiert nach der Respirationskammer zwei Schwefelsäureflaschen, wo das ausgeatmete Wasser, drei Natronkalkflaschen, wo die Kohlensäure aufgenommen wird; in einer letzten Schwefelsäureflasche wird bei der Bindung der Kohlensäure frei werdendes Wasser zurückgehalten.

Der Gang der Versuche.

Vor jedem Versuch wurden die Kaninchen auf einer Dezimalwage bis auf 10 g genau gewogen und ihre Rectaltemperatur mit einem gewöhnlichen Maximumthermometer bestimmt. Gutes Halten der Tiere ist dabei Voraussetzung; denn sobald sich die Kaninchen sträuben können, so steigt auch die Temperatur sofort. Das Versuchstier wurde sodann in die Respirationskammer verbracht, die Außentemperatur auf die gewünschte Höhe gesteigert, die Luft vorläufig noch durch eine Nebenleitung abgesogen.

Das Gewicht der Absorptionsflaschen wurde bis auf Zentigramm

Digitized by Google

genau bestimmt; ein jeder Versuch erforderte also zwölf Wägungen, d. h. zweimal je sechs Flaschen. Eine größere Genauigkeit als Zentigramm hatte keinen Sinn, da die Kaninchen ja nur auf 10 g genau gewogen wurden, wobei dann bei der Ausrechnung der Kohlensäure- resp. Wasserabgabe auf Kilogramm Körpergewicht und Stunde direkt ein Fehler gemacht worden wäre. Der eigentliche Versuch begann erst, wenn die erwünschte Temperatur in der Respirationskammer erreicht war. Die Dauer betrug eine Stunde, nachdem anfänglich halbstündige Versuche gemacht worden waren, die aber aus der Überlegung heraus fallen gelassen wurden, daß eventuell vorgekommene und nie ganz ausschaltbare Fehlerquellen sich bei der Ausrechnung auf Stunde und Kilogramm Körpergewicht immer verdoppeln. Bei 33° C Außentemperatur z. B. zeigt ein Normaltier erst nach 3—5 Minuten fliegende Atmung; ein halbstündiger Versuch hätte also ein Sechstel der Zeit nicht bei der für 33° C Außentemperatur normal fliegenden Atmung stattgefunden. Bei einem einstündigen Versuch sinkt demnach die Fehlerquelle auf die Hälfte. Länger wie eine Stunde umgekehrt sind die Versuche auch nicht ausdehnbar, weil sonst die Tiere bei 33° C Außentemperatur zu speicheln anfangen und so das Resultat der Wasserabgabe unbrauchbar machen.

Wie groß der Einfluß der Fütterung bei diesen Untersuchungen war, zeigten am besten Kaninchen B IV und C I. Diese Tiere waren frisch zugekauft und an ihrem früheren Standort mit Grünfutter gefüttert worden. Anfänglich zeigten sie bei 23° C Außentemperatur Werte der Wasserausscheidung von 2,161 resp. 2,102 g, währenddem sie nachher beim Trockenfutter auf einen Durchschnitt von 1,606 resp. 1,682 g pro Kilogramm Körpergewicht und Stunde sanken. Noch deutlicher zeigte sich der Einfluß bei 33° C Außentemperatur, wo die Tiere in einem ersten Versuch 4,331 resp. 4,401 g Wasser abgaben, bei Trockenfutter aber sofort auf Durchschnittswerte von 2,544 resp. 2,510 g zurückgingen.

Schon von Anfang an wurde daher in Fütterung und Futterzeit auf größte Konstanz gedrungen. Die Tiere wurden einmal pro Tag gefüttert, jeweilen am Abend und kamen am nächsten Nachmittag, also nüchtern, in Versuch. Die Fütterung bestand ausschließlich in Heu, Hafer und Wasser. Auch die Haltung der Kaninchen war eine peinlich saubere, so daß das Fell immer rein und trocken war, ein Zustand, dessen Fehlen bei der relativ starken Ventilation von 120 Liter pro Stunde, die übrigens bei allen Versuchen genau innegehalten wurde. einen nicht unbedeutenden Fehler im Wasserwert hätte darstellen können.

Ursprünglich waren die Temperaturen auf 23° C und 33° C festgelegt. Die heiße Witterung in den Augusttagen zwang aber, bei neu in Untersuchung kommenden Tieren die untere Temperatur auf 25° C festzusetzen. Tiere, bei denen die Vorversuche bei 23° C ausgeführt worden waren, konnten weiter nur Verwendung finden, wenn künstlich gekühlt wurde. Am besten hat sich dabei das Auflegen naßkalter Lappen auf den Zylinder bewährt. Ein Eintauchen der Schwefelsäurevorflasche in Eiswasser und folgliches Einleiten eines kalten Luftstromes in die Respirationskammer war nicht brauchbar. Tiere, die weit hinten im Apparat saßen, und die

Digitized by Google

der kalte eintretende Luftstrom immer genau an der gleichen Stelle traf, fingen an zu zittern, was jeweilen einen Ausschlag in der Kohlensäureabgabe nach oben zur Folge hatte.

Die Operationen.

Die Operationen wurden alle unter peinlichster Beobachtung der A- und Antisepsis durchgeführt. Das Futter wurde am Tage vor der Operation etwas reduziert; die Operation fand am nüchternen Tiere statt. Eine vollständige und noch einige Stunden über den chirurgischen Eingriff hinaus andauernde Narkose wurde durch subcutane Injektion von 1 ccm 4 proz. Morphiumlösung erreicht.

a) Die Thyreoidektomie bestand in einem 2—3 cm langen Medianhautschnitt vom Kehlkopf ab oralwärts. Eine Durchtrennung von Fascie und links- und rechtsseitiger Halsmuskulatur legte die Trachea frei; durch seitliches Herabdrücken der Muskulatur werden die braunrötlichen, länglichen, schwach bohnengroßen Thyreoideaseitenlappen sichtbar; der Isthmus ist als schwach gelbrötlicher 2—3 mm breiter Streifen erkennbar und sieht einem dünnen Blutextravasat ähnlich.

Die Seitenlappen wurden mit Pinzetten erfaßt, leicht hochgehoben und die bindegewebige Verbindung mit der Trachea unter größter Sorgfalt und Schonung des Nervus recurrens gelöst. Die Thyreoidea versorgenden Gefäße, inklusive die stark ausgebildete Vene, wurden mit feinen Arterienklemmen abgedreht, durchschnitten oder zerrissen, Blutungen traten bei diesem bloßen Abklemmen keine auf oder wenigstens nur solche, die durch sachtes Auflegen eines Tupfers sofort gestillt werden konnten. Von einer Unterbindung des Isthmus wurde abgesehen. Die beiden Lappen wurden zusammenhängend exstirpiert. Der große Vorteil dieser Methode besteht einmal darin, daß keine Ligaturen in der Operationswunde zurückbleiben, und zum andern, daß eine wirklich vollständige Entfernung der Thyreoidea gesichert ist. Beim Anlegen von Ligaturen ist es sehr wohl möglich, gerade am oralen Pol der Lappen, wo ein größeres Gefäß in die Thyreoidea eintritt und wo sie ziemlich fest mit der Trachea verbunden ist, ein Stückchen Drüse mit abzubinden, das so funktionsfähig bleibt. Fascie und Muskulatur werden durch Catgutknopfnaht, die Haut durch fortlaufende Naht, wieder verbunden. Ein Jodanstrich, doppelter Gazestreifen und Kollodium sollten die Wunde vor Infektion schützen.

In Krause[8]), die Anatomie des Kaninchens, wird das Gewicht der Schilddrüse mit 0,1 g angegeben; die von mir exstirpierten Drüsen wogen 0,08—0,14, im Maximum 0,17 g.

b) Die Thymektomie. Wie bei der Thyreoidektomie so wird auch hier durch einen 3 cm langen von Mitte Hals bis Manubrium sterni reichenden Schnitt durch Haut, Fascie und Muskulatur die Trachea freigelegt. Mittels stumpfen Haken wird das Brustbein in die Höhe gehoben, die ventrale Halsmuskulatur leicht seitwärts gezogen. Ventral der Gabelung der Vena cava cran. ist der vordere Zipfel der Thymus als gräuliches, fettähnliches Gewebe sichtbar, umgeben von einer dünnen Bindegewebskapsel. In dieser Gegend weist die Drüse ziemlich schwer lösbare Verbindungen

Digitized by Google

mit den Gefäßen auf. Die Kapsel wird vorsichtig angeschnitten, die Thymus mit breiten Pinzetten gefaßt und durch leichten Zug entwickelt. Zur vollständigen Exstirpation erfordert das äußerst leicht zerreißbare Organ neben großer Vorsicht fast im Widerspruch zur Größe der Drüse stehende breite Pinzetten. Die beiden Lappen lösen sich im allgemeinen sehr leicht. Eine allfällige venöse Blutung ist durch Aufdrücken eines Tupfers sofort stillbar, hat übrigens bei aseptischem Vorgehen nichts zu bedeuten. Üble Folgen wurden wenigstens nie beobachtet.

Bei älteren, und ich bezeichne hier 3 Monate alte Tiere, für diese Operation als alt, oder bei solchen, wo die Thymus infolge Krankheit speziell Leber- und Darmcoccidiose einer akzidentellen Involution anheimgefallen ist, wird es eventuell notwendig, zur bessern Übersicht des Operationsfeldes das Sternum in seiner oralen Partie zu spalten.

Naht und Verband wird in gleicher Weise wie bei Thyreoidektomie angelegt.

c) Die Doppeloperation, d. h. Thyreo-Thymektomie ist eine Kombination der beiden Einzeloperationen, wobei der Haut-Muskelschnitt von Kehlkopf bis Sternum gezogen wird. Ich persönlich ziehe es jeweilen vor, zuerst die Thyreoidea und dann die Thymus zu exstirpieren, um bei einem schlechterdings leicht möglichen einseitigen Pneumothorax die Operationswunde rasch verschließen zu können.

An den Folgen der verschiedenen Operationen sind von 11 Tieren die 3 erstoperierten umgestanden. Todesursache war einmal beidseitiger Pneumothorax, einmal beidseitige Pneumonie, wahrscheinlich infolge Recurrensverletzung; bei einem Tier, das an tetanieähnlichen Symptomen umstand, war die Todesursache nicht sicher feststellbar.

Im übrigen heilten alle Wunden per primam ab; später ausgeführte Sektionen bewiesen die sowohl vollständige Entfernung der Thyreoidea als auch der Thymus; verdächtige Gewebspartien im besonderen größere Fettpartien wurden jeweilen mikroskopisch untersucht. Von Krause wird das Gewicht der Thymus beim Kaninchen mit 1,1 g angegeben. Klose und Vogt[9]) fanden nach eigenen Bestimmungen bei Tieren im Alter bis zu 7 Wochen ein durchschnittliches Thymusgewicht von 2,6 g. Nach Söderlund und Backmann[10]) beträgt das Thymusgewicht von 4—6 Wochen alten Kaninchen 1,07 g und steigt auf maximal 2,49 g bei 4 Monate alten Kaninchen. Die von mir operierten Tiere standen in einem mittleren Alter von 10 Wochen und wogen 1100—1800 g, im Mittel 1530 g. Das Gewicht der exstirpierten Drüsen schwankte von 1,32—2,63 g und betrug im Mittelwert 1,97 g.

I. Thyreoidektomierte Tiere.

Am auffallendsten wohl und funktionell auch am einschneidendsten ist die Ausschaltung der Thyreoidea. Bereits zwei Tage nach der Operation stehen die Kohlensäure- und Wasserwerte auf dem Minimum des Normalen, um dann stetig bis auf ca. 60—65% der Durchschnittszahlen vor der Operation zu sinken. Dabei ist die Abnahme bei 33° C Außentemperatur ausgesprochener als bei 23° C.

Digitized by Google

Deutlicher als alle Worte sprechen hier die Versuchsprotokolle und die graphischen Darstellungen (Abb. 1, 2, 3, 4) im Anhang.

Thyreoidektomiertes Kaninchen A. I. (Abb. 1 u. 2).

a) Bei 25° C Außentemperatur (Abb. 1).
Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körper-gewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atem-frequenz pro Minute
20. VIII.	192	1420	1,327	1,187	40—44
22. VIII.	202	1440	1,233	1,153	35
26. VIII.	213	1500	1,180	1,000	40
29. VIII.	223	1500	1,057	1,030	38
1. IX.	234	1540	1,240	1,331	36
Normaldurchschnittswert:			1,205	1,140	

Zustand: thyreoidealos.
Datum der Operation: 3. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körper-gewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atem-frequenz pro Minute
5. IX.	246	1570	1,077	1,045	35
8. IX.	254	1550	1,065	0,852	35
10. IX.	263	1610	1,155	0,876	34
12. IX.	270	1640	1,009	0,798	33—36
15. IX.	277	1680	0,798	0,729	35
17. IX.	285	1660	0,798	0,681	32
19. IX.	292	1690	0,834	0,751	31—40
Durchschnittswerte:			0,962	0,819	
In % der Normaldurchschnittswerte:			79,8	71,8	

b) Bei 33° C Außentemperatur (Abb. 2).
Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körper-gewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge C_2O in g	H_2O in g	Atem-frequenz pro Minute
21. VIII.	201	1420	1,007	2,268	fliegend
23. VIII.	205	1440	1,146	2,514	„
27. VIII.	218	1510	1,235	2,589	„
30. VIII.	229	1520	1,138	2,336	„
2. IX.	239	1520	1,178	2,454	„
Normaldurchschnittswert:			1,141	2,432	

Digitized by Google

Zustand: thyreoidealos. Datum der Operation: 3. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
6. IX.	249	1580	1,089	2,089	fliegend
9. IX.	258	1580	0,987	1,747	180
11. IX.	266	1610	0,708	1,478	120—150
13. IX.	273	1670	0,922	1,497	100—180
16. IX.	281	1650	0,836	1,261	160—leicht fl.
18. IX.	287	1670	0,626	1,317	125—185
20. IX.	295	1690	0,680	1,521	56—185
Durchschnittswert:			0,835	1,559	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			73,2	64,1	

Thyreoidektomiertes Kaninchen A. II. (Abb. 3 u. 4).

a) Bei 23° C Außentemperatur (Abb. 3).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
6. VIII.	144	1160	1.280	0,914	44
8. VIII.	154	1210	1,438	1,091	50
11. VIII.	160	1290	1,391	1,116	46
13. VIII.	170	1290	1,221	0,892	53
15. VIII.	177	1360	1,360	0,971	44
19. VIII.	190	1350	1,204	0,937	45—56
25. VIII.	211	1510	1,066	0,848	30
29. VIII.	227	1530	0,961	1,105	36—40
1. IX.	232	1590	1,182	1,050	40
Normaldurchschnittswert:			1,223	0,992	

Zustand: thyreoidealos. Datum der Operation: 3. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
5. IX.	245	1540	0,919	0,800	32—34
8. IX.	252	1610	0,925	0,894	33
10. IX.	262	1720	1,041	0,814	43
12. IX.	268	1710	1,164	0,778	46
15. IX.	275	1750	0,977	0,657	35
17. IX.	284	1740	0,828	0,770	35
19. IX.	291	1800	0,786	0,800	36—41
Durchschnittswert:			0,949	0,788	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			77,6	79,4	

Digitized by Google

b) Bei 33° C Außentemperatur (Abb. 4).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
7. VIII.	148	1170	1,286	2,423	fliegend
9. VIII.	156	1200	1,229	2,563	„
12. VIII.	165	1290	1,248	2,132	„
14. VIII.	173	1300	1,173	2,100	„
16. VIII.	181	1360	1,173	2,015	
18. VIII.	185	1420	1,254	2,000	„
21. VIII.	197	1450	1,087	2,112	„
26. VIII.	216	1500	1,073	2,377	„
2. IX.	238	1560	1,029	2,282	„
Normaldurchschnittswert:			1,172	2,223	

Zustand: thyreoidealos.

Datum der Operation: 3. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
6. IX.	248	1570	1,009	1,981	170
9. IX.	257	1670	0,814	1,617	130
11. IX.	267	1700	0,941	1,512	126—130
13. IX.	272	1710	0,725	1,491	100—180
16. IX.	280	1780	0,680	1,219	68—135
18. IX.	286	1790	0,667	1,243	98—126
Durchschnittswert:			0,806	1,511	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			68,8	68,0	

Nach den Protokollen von Hauri zeigen sich nach 12—20 Tagen überall den Normalabgaben von Kohlensäure und Wasser entsprechende Werte, mit anderen Worten, ein Abklingen der Reaktion. Bis 17 Tage nach der Thyreoidektomie war in meinen Untersuchungen nur in der Wasserausscheidung von A. II bei 23° C Außentemperatur eine leise Andeutung der Rückkehr zur Norm. Da speziell ein eventueller Einfluß der Thymus nach Thyreoidektomie erforscht werden sollte, so fand die Thymektomie gerade in dem Moment statt, als im allgemeinen das Minimum der Kohlensäure und Wasserabgabe erreicht war. In bezug auf das Abklingen der Reaktion stütze ich mich also lediglich auf die Angaben von Hauri.

Digitized by Google

Die Veränderungen der Respirationsfrequenz und Rectaltemperatur nach Thyreoidektomie sollen in einem besondern Kapitel besprochen werden.

Diese beiden Tiere und überhaupt alle zeigen normal bei 23° C Außentemperatur eine größere Kohlensäureabgabe als bei 33° C, die Wasserwerte stehen gerade umgekehrt. In dieser Tatsache erkennen wir ein schon längst bekanntes Gesetz der Wärmeregulation, nämlich, daß bei zunehmender Außentemperatur die Wasserabgabe steigt (physikalische Wärmeregulation), die Kohlensäurebildung aber sinkt (chemische Wärmeregulation).

II. Thymektomierte Tiere.

Wie aus den folgenden Tabellen ersichtlich, und ich möchte fast sagen, wie nach allen bisherigen experimentellen Thymusausschaltungen nicht anders zu erwarten war, trat eine Reaktion in bezug auf Kohlensäure- und Wasserabgabe nach bloßer Thymektomie trotz veränderter Außentemperatur nur sehr undeutlich in Erscheinung, und das veranlaßte auch die eingehendere Kombination und Variation der beiden in Frage stehenden Organe. Die Resultate aus der Thymektomie allein zu verwerten, wäre gewagt und unsicher. Die angeführten Versuchsprotokolle zeigen klar, daß ein eindeutiger Schluß aus Thymektomie für sich allein nicht zu ziehen ist. Ein Tier, Kaninchen B. I. (Abb. 5, 6, 7), trotzdem schon relativ alt (ca. 12 Wochen), hat auf Thymektomie stark reagiert, sowohl die Kohlensäure- als auch die Wasserabgabe ist bei allen drei Wärmegraden (23, 27, 33°) gesunken, was also auf einen de norma fördernden Einfluß der Thymus deuten würde. Auch wenn wir eine spontane geringe Abnahme der diesbezüglichen Werte eines Kontrolltieres in Berücksichtigung ziehen, so ist eine Verminderung doch unverkennbar. Die relativ kurze Dauer der Versuche bei diesem Tier, das ursprünglich als „Doppeltier" hätte dienen sollen, das aber an den Folgen der Thyreoidektomie an den bereits erwähnten tetanieähnlichen Symptomen umstand, erlaubt nicht, die Reaktion als gesetzmäßig hinzustellen. Immerhin ist zu bemerken, daß positiv ausgefallene Experimente bewertet werden müssen, indem für „negative Versuche" Erklärungen genug zur Hand geschafft werden können. Ebenfalls, wenn auch in geringerem Maße, zeigte sich bei den ekthymierten Tieren B. II (Abb. 8 u. 9) und B. IV (Abb. 12 u. 13) eine Abnahme in Kohlensäure und Wasserabgabe.

Im Gegensatz dazu hat Kaninchen B. III (Abb. 10 u. 11), dem als 10 Wochen alt eine Thymus im Gewichte von 2,63 g exstirpiert wurde, wo schon die Größe des Organs auf eine vollständige Thymektomie schließen läßt, wie man sich übrigens auch an den glatten Umrissen der Drüse überzeugen konnte, in dem, nach den früheren Resultaten erwarteten Sinne sehr schwach, in den Kohlensäurewerten gerade entgegengesetzt, d. h. mit Vermehrung reagiert. Die postoperativen Versuche fielen allerdings in die ungünstigste Zeit eines allgemeinen Temperatursturzes, der einen vermehrten Stoffwechsel, wie auch Kontrolltiere zeigten, erwarten ließ.

Digitized by Google

Die oben angeführten stichhaltigen Erklärungen für resultatlos ausgefallene Versuche finden wir bei Matti. Einmal können funktionstüchtige Thymusmetamere, wie sie nach Groschuff[11]) u. a. bei vielen Säugern vorkommen, oder von der eigentlichen Thymusanlage (3. Tasche) abgelöste Thymusläppchen (äußeres akzessorisches Thymusläppchen) ursächlich in Betracht fallen. Unvollständige Thymusexstirpation ist im weitern ein wesentliches mitbeeinflussendes Moment, darf aber hier auf Grund der negativen Sektionen ausgeschaltet werden. Nicht ganz von der Hand zu weisen und mit dem schwachen Ausschlag eventuell in Verbindung stehend ist dagegen das schon etwas vorgeschrittene Alter der Tiere, indem in der dritten Lebenswoche das Maximum des relativen Thymusgewichtes beim Kaninchen mit 3,33 g angegeben wird. Der Vollständigkeit halber sei auch die von Basch, Klose, Vogt und Matti angeführte Beobachtung erwähnt, wonach Kaninchen und überhaupt Herbivoren wegen geringer Thymusentwicklung und frühzeitigem großen Kalkreichtum des Knochensystems nicht regelmäßig und nicht intensiv auf die Entfernung der Thymus reagieren. Es dürfte sich diese Bemerkung wohl mehr auf ihre Untersuchungen in bezug auf Veränderungen am Knochensystem beziehen. Immerhin dürfte es sich empfehlen, diese Untersuchungen, denen nun der Weg gewiesen ist, an anderen, günstigeren Versuchsobjekten zu überprüfen.

Das größte Gewicht möchte ich aber gerade auch als Folgerung aus den übrigen Versuchen dieser Arbeit auf die Korrelation und den funktionellen Konnex mit anderen innersekretorischen Drüsen, speziell mit der Schilddrüse legen. In dieser Beziehung will Matti berücksichtigt wissen, „daß gewisse Organe (Thyreoidea, Epithelkörperchen) in ihrer Wirkung entsprechend auch hinsichtlich ihres Ausfalles, mit der Thymus nahe verwandt sind und daß dieses Verhältnis vikariierendes Eintreten verwandter Organe für die Thymus möglich erscheinen läßt."

Auf Grund dieser Versuchsserie können wir also bloß sagen, daß nach Thymektomie beim Kaninchen die Kohlensäure- und Wasserabgabe nur sehr gering vermindert ist. Jeden fördernden Einfluß dürfen wir, wie spätere Ergebnisse zeigen, der Thymus aber nicht von vornherein absprechen.

Thymektomiertes Kaninchen B. I (Abb. 5, 6, 7).

a) Bei 23° C Außentemperatur (Abb. 5).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
25. VI.	11	1690	1,420	1,598	—
27. VI.	20	1720	1,756	1,680	—
4. VII.	38	16[illegible]0	1,521	1,515	—
Normaldurchschnittswert:			1,566	1,598	

Digitized by Google

Zustand: thymuslos.

Datum der Operation: 7. VII. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
9. VII.	55	1870	1,476	1,497	—
11. VII.	72	1980	1,333	1,106	—
14. VII.	76	1980	1,288	0,965	—
15. VII.	83	1970	1,279	1,036	—
16. VII.	89	2000	1,350	1,090	—
Durchschnittswert:			1,345	1,139	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			85,9	71,2	

b) Bei 27° C Außentemperatur (Abb. 6).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
20. VI.	2	1640	1,585	2,396	—
23. VI.	5	1630	1,570	1,840	—
25. VI.	15	1690	1,390	1,976	—
28. VI.	23	1730	1,295	1,769	—
4. VII.	41	1690	1,278	1,752	—
Normaldurchschnittswert:			1,424	1,947	

Zustand: thymuslos.

Datum der Operation: 7. VII. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
9. VII.	57	1870	1,166	1,925	—
12. VII.	64	1940	1,201	1,577	—
14. VII.	78	1980	1,194	1,091	—
15. VII.	85	1970	1,305	1,426	—
16. VII.	91	2000	1,290	1,410	—
Durchschnittswert:			1,231	1,486	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			86,4	76,3	

Digitized by Google

c) Bei 33° C Außentemperatur (Abb. 7).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
24. VI.	8	1630	1,552	2,791	fliegend
26. VI.	17	1680	1,328	2,589	„
2. VII.	36	1760	1,551	2,602	„
4. VII.	43	1690	1,414	2,580	„
Normaldurchschnittswert:			1,461	2,641	

Zustand: thymuslos.

Datum der Operation: 7. VII. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
9. VII.	59	1870	1,235	2,417	fliegend
12. VII.	68	1940	1,170	2,139	„
14. VII.	80	1980	1,268	1,975	„
15. VII.	87	1970	1,274	1,802	„
16. VII.	94	2000	1,510	1,915	„
Durchschnittswert:			1,291	2,049	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			88,4	77,6	

Thymektomiertes Kaninchen B. II (Abb. 8, 9).

a) Bei 25° C Außentemperatur (Abb. 8).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
20. VIII.	194	1250	1,380	1,284	60
22. VIII.	204	1250	1,296	1,336	45
26. VIII.	215	1290	1,264	1,217	60
29. VIII.	225	1320	1,167	1,477	—
1. IX.	235	1340	1,246	1,511	100
4. IX.	242	1230	1,187	1,057	44—50
8. IX.	255	1230	1,179	1,439	44—60
10. IX.	264	1280	1,148	1,016	42
Normaldurchschnittswert:			1,233	1,292	

Digitized by Google

Zustand: thymuslos.

Datum der Operation: 11. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
13. IX.	271	1330	1,327	1,278	50—53
16. IX.	279	1370	1,305	1,261	46
19. IX.	293	1370	1,066	1,474	65
26. IX.	314	1440	1,242	1,308	—
10. X.	344	1430	1,133	1,266	68
17. X.	355	1400	1,207	1,157	40
Durchschnittswert:			1,213	1,291	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			98,4	100	

b) Bei 33° C Außentemperatur (Abb. 9).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
21. VIII.	199	1200	1,000	2,500	fliegend
23. VIII.	208	1250	1,020	2,536	„
27. VIII.	220	1310	1,271	2,962	„
30. VIII.	231	1330	1,147	3,158	„
2. IX.	240	1260	1,230	3,492	„
5. IX.	247	1260	1,167	3,230	„
9. IX.	259	1230	1,163	3,057	„
Normaldurchschnittswert:			1,143	2,991	

Zustand: thymuslos.

Datum der Operation: 11. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
15. IX.	278	1320	1,019	2,742	fliegend
18. IX.	289	1360	0,956	2,647	„
22. IX.	299	1400	1,014	2,908	„
30. IX.	324	1410	1,167	2,936	„
9. X.	340	1450	1,117	2,689	„
17. X.	357	1400	1,207	2,564	„
Durchschnittswert:			1,080	2,748	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			94,5	91,9	

Digitized by Google

Thymektomiertes Kaninchen B. III (Abb. 10 u. 11).

a) Bei 23° C Außentemperatur (Abb. 10).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körper-gewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atem-frequenz pro Minute
12. IX.	269	1420	1,035	1,387	53
15. IX.	276	1430	1,119	1,245	40—46
17. IX.	283	1440	1,142	1,050	39
19. IX.	290	1460	1,219	1,274	46
Normaldurchschnittswert:			1,129	1,239	

Zustand: thymuslos.

Datum der Operation: 20. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körper-gewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atem-frequenz pro Minute
22. IX.	297	1450	1,090	—	50
24. IX.	304	1480	0,892	1,196	34
26. IX.	311	1500	1,327	1,333	66
29. IX.	319	1530	1,209	1,235	36
2. X.	326	1580	1,323	1,291	48
4. X.	331	1570	1,401	1,280	100
7. X.	337	1610	1,357	1,261	95
10. X.	342	1640	1,250	1,183	—
13. X.	348	1620	1,093	1,012	60
17. X.	354	1640	1,146	0,988	100
21. X.	361	1770	1,277	0,870	52
Durchschnittswert:			1,215	1,165	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			107,6	94,0	

b) Bei 33° C Außentemperatur (Abb. 11).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körper-gewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atem-frequenz pro Minute
13. IX.	274	1420	1,063	2,584	fliegend
16. IX.	282	1440	0,917	2,514	„
18. IX.	288	1440	1,066	2,493	„
20. IX.	294	1470	1,204	2,939	„
Normaldurchschnittswert:			1,063	2,633	

Digitized by Google

Zustand: thymuslos.
Datum der Operation: 20. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
23. IX.	302	1470	1,245	2,567	fliegend
25. IX.	309	1490	1,077	2,436	„
27. IX.	317	1520	1,115	2,421	„
30. IX.	323	1540	1 159	2,312	„
3. X.	330	1550	1,319	—	„
6. X.	335	1610	1,329	2,789	„
9. X.	339	1670	1,254	2,611	„
13. X.	350	1620	1,188	2,451	„
18. X.	359	1680	1 182	2,446	„
21. X.	363	1770	1,201	1,876	„
Durchschnittswert:			1,207	2,434	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			113,5	92,4	

Thymektomiertes Kaninchen B. IV (Abb. 12, 13).
a) Bei 23° C Außentemperatur (Abb. 12).
Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
11. VII.	62	1270	1,354	1,606	—
14. VII.	74	1340	1,395	1,351	—
15. VII.	81	1350	1,481	1,674	—
16. VII.	97	1360	1,401	1,792	—
Normaldurchschnittswert:			1,408	1,606	

Zustand: thymuslos.
Datum der Operation: 17. VII. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
22. VII.	105	1450	1,606	1,614	—
23. VII.	110	1450	1 362	1,397	—
24. VII.	113	1460	1,353	1,370	—
28. VII.	115	1500	1,437	1,387	—
30. VII.	122	1540	1,354	1,299	—
2. VIII.	134	1530	1,200	1,118	—
4. VIII.	138	1550	1,209	1,019	—
Durchschnittswerte:			1,360	1,315	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			96,6	81,8	

b) Bei 33° C Außentemperatur (Abb. 13).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
13. VII.	70	1290	1,294	2,700	fliegend
15. VII.	86	1350	1,319	2,644	„
16. VII.	93	1360	1,412	2,287	„
Normaldurchschnittswert:			1,342	2,544	

Zustand: thymuslos.

Datum der Operation: 17. VII. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
21. VII.	103	1440	1,242	2,236	180
22. VII.	109	1450	1,324	2,276	170
23. VII.	112	1450	1,331	2,562	fliegend
28. VII.	117	1500	1,337	2,520	„
30. VII.	125	1540	1,227	2,097	190
2. VIII.	136	1530	1,206	2,314	190
4. VIII.	140	1550	1,181	2,129	190
Durchschnittswerte:			1,264	2,305	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			94,2	90,6	

III. Thyreo-thymektomierte Tiere.

Nach Doppeloperation ist in ausgesprochenem Maße das eingetreten, was sich aus den Resultaten nach Thyreoidektomie und Thymektomie ergeben mußte, nämlich eine sehr starke, bis zu 40% und mehr betragende Senkung in Kohlensäure- und Wasserabgabe. Ein vikariierendes Eintreten der beiden Drüsen war durch die gleichzeitige Operation ausgeschlossen; durch diese mächtige Senkung des respiratorischen Stoffwechsels nach Schilddrüsen-Thymusentfernung erhält die Annahme eines funktionellen Zusammenhanges innersekretorischer Drüsen eine neue Stütze.

Der wesentliche Unterschied zur Thyreoidektomie besteht in dem Nichtwiederanstieg der Kohlensäure- und Wasserausscheidung, d. h. dem Nichtabklingen der Reaktion. Die Thymus übernähme demnach bei Fehlen der Schilddrüse deren fördernde Funktion; mit ihrer Exstirpation

Digitized by Google

fällt diese Möglichkeit dahin, die Werte bleiben unten. Sehr anschaulich bringen dies die Kurven der Abb. 14, 15, 16, 17 im Anhang zur Darstellung.

Thyreo-thymektomiertes Kaninchen C. I (Abb. 14, 15).

a) Bei 23° C Außentemperatur (Abb. 14).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
11. VII.	63	1290	1,372	1,806	—
14. VII.	75	1350	1,607	1,785	—
15. VII.	82	1340	1,463	1,828	—
16. VII.	96	1410	1,461	1,723	—
21. VII.	99	1430	1,238	1,664	—
22. VII.	104	1440	1,326	1,674	—
23. VII.	111	1440	1,354	1,291	—
Normaldurchschnittswert:			1,403	1,682	

Zustand: thyreoidea- und thymuslos.

Datum der Operation: 26. VII. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
28. VII.	116	1460	1,250	1,390	—
29. VII.	119	1480	1,277	1,456	—
31. VII.	126	1540	1,075	1,338	—
2. VIII.	133	1550	0,977	1,123	—
5. VIII.	142	1580	0,930	0,801	—
6. VIII.	145	1570	0,828	0,745	—
8. VIII.	153	1620	0,904	0,821	—
11. VIII.	161	1610	0,795	0,944	—
13. VIII.	168	1630	0,991	0,883	—
15. VIII.	178	1630	0,883	0,724	—
19. VIII.	188	1650	1,091	0,800	—
25. VIII.	210	1680	0,720	0,729	—
1. IX.	233	1650	0,764	0,858	—
10. IX.	261	1720	0,750	0,552	—
Durchschnittswert:			0,945	0,940	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			67,4	55,9	

Digitized by Google

b) Bei 33° C Außentemperatur (Abb. 15).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
13. VII.	71	1300	1,653	2,792	fliegend
15. VII.	88	1340	1,373	2,433	„
21. VII.	102	1430	1,405	1,888	„
22. VII.	108	1440	1 236	2,562	„
24. VII.	114	1460	1,438	2,877	„
Normaldurchschnittswert:			1,421	2,510	

Zustand: thyreoidea- und thymuslos.

Datum der Operation: 26. VII. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
28. VII.	118	1460	1,267	2,288	leicht fliegend
31. VII.	128	1540	1,097	2 123	„ „
1. VIII.	132	1550	0,993	2,052	„ „
5. VIII.	143	1580	0,810	1,709	, „
7. VIII.	151	1590	0,849	1,837	„ „
9. VIII.	159	1630	0,828	1,564	170
12. VIII.	167	1620	0,790	1,272	58
14. VIII.	175	1640	0,707	1,561	80—110
16. VIII.	183	1630	0,748	1,313	95
18. VIII.	187	1630	0,603	1,428	140
20. VIII.	195	1630	0,669	1,454	160—180
26. VIII.	217	1640	0,695	1,938	leicht fliegend
2. IX.	236	1670	0,569	1,689	120—130
9. IX.	260	1690	0,604	1,420	59
Durchschnittswert:			0,802	1,689	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			56,4	67,3	

Digitized by Google

Thyreo-thymektomiertes Kaninchen C. II (Abb. 16 u. 17).

a) Bei 23° C Außentemperatur (Abb. 16).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körper-gewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atem-frequenz pro Minute
29. VII.	120	1030	1,714	1,709	130
30. VII.	123	1040	1,750	1,817	110
31. VII.	127	1060	1,637	1,670	110
1. VIII.	130	1120	1 982	2,214	100
2. VIII.	135	1100	1,809	1,627	110
4. VIII.	137	1100	1,500	1,364	70
5. VIII.	141	1100	1,605	1,450	100
Normaldurchschnittswert:			1,714	1,693	

Zustand: thyreoidea- und thymuslos.

Datum der Operation: 5. VIII. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körper-gewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atem-frequenz pro Minute
6. VIII.	147	1060	1,335	1,330	40—56
8. VIII.	155	1160	1.405	1,164	42
11. VIII.	163	1230	1 219	1,000	44
13. VIII.	171	1250	1,312	1,204	55
15. VIII.	179	1230	1,386	1,048	—
19. VIII.	191	1270	1,213	0,929	42
25. VIII.	212	1360	0,904	0,867	35
29. VIII.	226	1360	0,905	0,934	40
3. IX.	241	1410	1,156	1,227	46
8. IX.	253	1470	0,721	0,735	32
Durchschnittswert:			1,156	1,044	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			67,4	61,7	

b) Bei 33° C Außentemperatur (Abb. 17).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körper-gewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atem-frequenz pro Minute
30. VII.	124	1040	1,677	3,086	fliegend
31. VII.	129	1060	1,500	2,868	„
[illegible]. VIII.	131	1070	1,531	3,556	„
4. VIII.	139	1100	1 464	3,191	„
Normaldurchschnittswert:			1,551	3,175	

Digitized by Google

Zustand: thyreoidea- und thymuslos.
Datum der Operation: 5. VIII. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
7. VIII.	149	1090	1,266	2,606	fliegend
9. VIII.	157	1170	1,167	1,119	"
12. VIII.	166	1240	1,093	1,871	"
14. VIII.	174	1230	1,031	1,724	180
16. VIII.	182	1260	0,849	1,444	180
18. VIII.	186	1320	1,000	1,432	190
21. VIII.	198	1300	0,869	1,484	80—120
23. VIII.	206	1320	0,731	1,621	180
27. VIII.	221	1380	0,622	1,812	140
2. IX.	237	1450	0,789	1,793	160
6. IX.	251	1380	0,700	1,400	90—115
11. IX.	265	1460	0,188	1,336	108—128
Durchschnittswert:			0,911	1,720	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			58,7	54,2	

IV. Thymektomierte und nachträglich thyreoidektomierte Tiere.

Wenn die Annahme, Thymus und Thyreoidea seien in bezug auf Kohlensäure- und Wasserabgabe gleichsinnig fördernd wirkende Organe, zu Recht bestehen sollte, so dürfte nach Thymektomie, also nach Wegnahme der geringeren Komponente, ein Ausfall nur gering sein, weil die Schilddrüse vikariierend eintrat. Bei sekundärer Thyreoidea-Exstirpation aber müßte eine rasche Verminderung der Kohlensäure- und Wasserabgabe sich einstellen, eine Überlegung, die durch den Versuch ihre Gültigkeit erlangen sollte.

Kaninchen B. IV zeigt eine geringe Abnahme der fraglichen Werte nach Thymektomie, starken Abfall aber nach Thyreoidektomie.

Für den weitern Verlauf muß gelten, was in einer Sitzung bei thyreothymektomierten Tieren gefunden wurde, nämlich ein Abklingen der Reaktion darf nicht eintreten. Tatsächlich ist aber bei diesem Tier nicht die geringste Zunahme, weder an Kohlensäure noch an Wasser erfolgt, und, wie Kontrollversuche 68 Tage nach der zweiten Operation, d. h. 40 Tage nach dem letzten Versuche dartun, ist der respiratorische Stoffwechsel weder bei 23° noch bei 33° C Außentemperatur gestiegen. Nicht einmal die Respirationsfrequenz, die, als das Tier am 30. VIII. wegen Trächtigkeit ausgeschaltet wurde, 66 pro Minute bei 33° C Außentemperatur betrug, ist stark in die Höhe gegangen. Sie erreichte nur 112 resp. 145 am Ende eines einstündigen Versuches, trotzdem das Tier inzwischen vier lebendige Junge geworfen hatte, die allerdings alle wenige Tage nach der Geburt eingingen, trotzdem es mit Gras gefüttert worden war, im Freien gehalten wurde, und die allgemeine Außentemperatur wesentlich tiefer

Digitized by Google

stand (12—14° C gegenüber 22—24° im August) und die Kontrollversuche in unserem Sinne nur ungünstig hätte beeinflussen können.

Thyreoidektomie nach Thymektomie löst eine markante Abnahme in CO_2 und H_2O-Abgabe aus, die tiefen Werte bleiben konstant unten.

Nebenbei konnte an diesem Tier die wertvolle, wenn auch nicht eigenartige Beobachtung gemacht werden, daß ein thymus- und thyreoidealoses Kaninchen, von einem thyreo-thymektomierten Männchen gedeckt, lebendige Junge zur Welt bringen kann. Kaninchen B. IV weiblich und C. I männlich waren allein in der gleichen Abteilung. B. IV wurde ekthymiert am 17. VII. 19, thyreoidektomiert am 5. VIII. 19. C. I, das Männchen, wurde thyreo-thymektomiert am 26. VII. 19. Die Geburt fand statt in der Nacht vom 2.—3. IX. Wird die Trächtigkeitsdauer des Kaninchens mit 4 Wochen angenommen, so fällt die Konzeption auf den 6. VIII. 1919, in eine Zeit also, da sowohl B. IV wie C. I ohne Thymus und Schilddrüse waren. An den Jungen war äußerlich nichts Abnormales auffallend.

Ekthymiertes und thyreoidektomiertes Kaninchen B IV
(Blatt 12 u. 13).

a) Bei 23° C Außentemperatur (Abb. 12).
Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
11. VII.	62	1270	1,354	1,606	—
14. VII.	74	1340	1,395	1,351	—
15. VII.	81	1350	1,481	1,674	—
16. VII.	97	1360	1,401	1,792	—
Normaldurchschnittswert:			1,408	1,606	

Zustand: thymuslos.
Datum der Operation: 17. VII. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
22. VII.	105	1450	1,607	1,614	—
23. VII.	110	1450	1 362	1,397	—
24. VII.	113	1460	1,353	1,370	—
28. VII.	115	1500	1,437	1,387	—
30. VII.	122	1540	1,354	1,299	—
2. VIII.	134	1530	1,200	1,118	—
4. VIII.	138	1550	1,209	1,019	—
Durchschnittswert:			1,360	1,315	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			96,6	81,8	

Digitized by Google

Zustand: thymus- und thyreoidealos.

Datum der Operation: 5. VIII. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
6. VIII.	146	1560	1,276	1,032	26
8. VIII.	152	1630	1,343	1,110	—
11. VIII.	162	1690	1,192	1,154	—
13. VIII.	169	1720	1,263	0,927	23
19. VIII.	189	1860	1,226	0,752	28
25. VIII.	209	1970	0,979	0,558	28
30. VIII.	228	2000	0,760	0,655	23—32
Durchschnittswert:			1,148	0,884	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			81,5	55,0	

Kontrollversuche.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
10. X.	341	1870	0,765	0,653	30
13. X.	347	1860	0,828	0,871	24
14. X.	351	1870	0,781	0,701	24
Durchschnittswert:			0,791	0,742	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			56,2	46,2	

b) Bei 33° C Außentemperatur (Abb. 13).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
13. VII.	70	1290	1,294	2,700	fliegend
15. VII.	86	1350	1,319	2,644	
16. VII.	93	1360	1,412	2,287	„
Normaldurchschnittswert:			1,342	2,544	

Digitized by Google

Zustand: thymuslos.
Datum der Operation: 17. VII. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
21. VII	103	1440	1,242	2 236	190
22. VII.	109	1450	1,324	2,276	170
23. VII.	112	1450	1,381	2,562	fliegend
28. VII.	117	1500	1,337	2,520	„
30. VII.	125	1540	1,227	2,097	190
2. VIII.	136	1530	1,206	2,314	190
4. VIII.	140	1550	1,181	2,129	190
Durchschnittswert:			1,264	2,305	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			94,2	90,6	

Zustand: thymus- und thyreoidealos.
Datum der Operation: 5. VIII. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stund abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
7. VIII.	150	1590	1,163	2,126	190
9. VIII.	158	1650	1,064	1,791	100
12. VIII.	164	1700	0,915	1,765	168
14. VIII.	172	1750	0,829	1,506	135
16. VIII.	180	1820	0,796	1,143	95
18. VIII.	184	1810	0,696	1,204	80—85
21. VIII.	196	1900	0,721	1,221	60—70
27. VIII.	222	1970	0,642	1,005	66
Durchschnittswert:			0,850	1,471	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			63,3	57,8	

Kontrollversuche.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
11. X.	346	1860	0,715	1,194	100—112
14. X.	353	1870	0,754	1,412	145
Durchschnittswert:			0,735	1,303	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			54,8	51,2	

Digitized by Google

V. Thyreo- und nachträglich thymektomierte Tiere.

Ausgeführt wurde diese Versuchsreihe, um zu wissen, ob nach Thyreoidektomie Thymektomie einen weiteren Abfall in Kohlensäure- und Wasserausscheidung bewirken könne, und nicht zuletzt sollte sie, sowohl direkt als indirekt, den fördernden Einfluß der Thymus bestätigen.

Bei nachträglicher Thymektomie thyreoidealoser Kaninchen tritt eine erneute Senkung der CO_2- und H_2O-Abgabe nicht ein. Die Thymusexstirpation verhindert aber das Abklingen der Reaktion. Die Kohlensäure- und Wasserausscheidung bleibt auf der tiefsten Stufe, wie sie nach Thyreoidektomie war, stehen, und kein einziger Wert erreicht auch nur annähernd die Höhe der beim Normaltier gefundenen.

Thyreoidektomiertes und ekthymiertes Kaninchen A. I
(Abb. 1 u. 2).

a) Bei 25° C Außentemperatur (Abb. 1).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
20. VIII.	192	1420	1,327	1,187	40—44
22. VIII.	202	1440	1,233	1,153	35
26. VIII.	213	1500	1,170	1,000	40
29. VIII.	223	1500	1,057	1,030	38
1. IX.	234	1540	1,240	1,331	36
Normaldurchschnittswert:			1,205	1,140	

Zustand: thyreoidealos.

Datum der Operation: 3. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
5. IX.	246	1570	1,077	1,045	35
8. IX.	254	1550	1,065	0,852	35
10. IX.	263	1610	1,155	0,876	34
12. IX.	170	1640	1,009	0,798	33—36
15. IX.	277	1680	0,798	0,729	35
17. IX.	285	1660	0,798	0,681	32
19. IX.	292	1690	0,834	0,751	31—40
Durchschnittswert:			0,962	0,819	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			79,8	71,8	

Digitized by Google

Zustand: thyreoidea- und thymuslos.
Datum der Operation: 20. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
22. IX.	298	1690	0,805	0,799	32—42
24. IX.	305	1690	0,749	0,763	36
26. IX.	313	1700	0,803	0,694	38
29. IX.	320	1730	0,798	0,803	36
2. X.	327	1710	0,792	0,754	33—40
4. X.	332	1690	0,801	0,739	34
7. X.	336	1750	0,866	0,863	32
10. X.	343	1710	0,772	0,643	30—36
13. X.	349	1690	0,787	0,639	30
17. X.	356	1640	0,841	0,689	28
21. X.	360	1740	0,822	0,713	30
Durchschnittswert:			0,803	0,736	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			66,6	64,6	

b) Bei 33° C Außentemperatur (Abb. 2). Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
21. IX.	201	1420	1,007	2,268	fliegend
23. IX.	205	1440	1,146	2,514	„
27. IX.	218	1510	1,235	2,589	„
30. IX.	229	1520	1,138	2,336	„
2. X.	239	1520	1,178	2,454	„
Normaldurchschnittswert:			1,141	2,432	

Zustand: thyreoidealos.
Datum der Operation: 3. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
6. IX.	249	1580	1,089	2,089	fliegend
9. IX.	258	1580	0,987	1,747	180
11. IX.	266	1610	0,708	1,478	120—150
13. IX.	273	1670	0,922	1,497	100—180
16. IX.	281	1650	0,836	1,261	160—180
18. IX.	287	1670	0,626	1,317	125—185
20. IX.	295	1690	0,680	1,521	56—185
Durchschnittswert:			0,835	1,559	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			73,2	64,1	

Digitized by Google

Zustand: thyreoidea und thymuslos.

Datum der Operation: 20. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
23. IX.	301	1690	0,701	1,449	96—190
25. IX.	307	1720	0,802	1,395	66—180
27. IX.	316	1710	0,787	1,333	180
30. IX.	322	1720	0,715	1,201	46—180
3. X.	329	1710	0,731	1,386	116—fliegend
6. X.	334	1730	0,789	1,283	60—190
9. X.	338	1750	0,757	1,811	fliegend
11. X.	345	1710	0,743	1,380	60—180
14. X.	352	1680	0,779	1,190	58—180
18. X.	358	1680	0,791	1,176	36—190
21. X.	362	1740	0,851	1,075	36—190
Durchschnittswert:			0,768	1,334	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			67,3	54,8	

Thyreoidektomiertes und ekthymiertes Kaninchen A. II (Abb. 3 u. 4).

a) Bei 23° C Außentemperatur (Abb. 3).

Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
6. VIII.	144	1160	1,280	0,914	44
8. VIII.	154	1210	1,438	1,091	50
11. VIII.	160	1290	1,291	1,116	46
13. VIII.	170	1290	1,221	0,892	53
15. VIII.	177	1360	1,360	0,971	44
19. VIII.	190	1350	1,204	0,937	45—56
25. VIII.	211	1510	1,066	0,848	30
29. VIII.	227	1530	0,961	1,105	36—40
1. IX.	232	1590	1,182	1,050	40
Normaldurchschnittswert:			1,223	0,992	

Digitized by Google

Zustand: thyreoidealos.
Datum der Operation: 3. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
5. IX.	245	1540	0,919	0,800	32—34
8. IX.	252	1610	0,925	0,894	33
10. IX.	262	1720	1,041	0,814	43
12. IX.	268	1710	1,164	0,778	46
15. IX.	275	1750	0,977	0,657	35
17. IX.	284	1740	0,828	0,770	35
19. IX.	291	1800	0,786	0,800	36—41
Durchschnittswert:			0,949	0,788	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			77,6	79,4	

Zustand: thyreoidea- und thymuslos.
Datum der Operation: 20. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
22. IX.	296	1770	0,805	0,650	32—42
24. IX.	303	1770	0,788	0,701	35
26. IX.	312	1750	0,897	0,811	36
29. IX.	318	1810	0,931	0,939	36
2. X.	325	1830	0,877	0,710	—
4. X.	331 a	1820	0,780	0,775	45
Durchschnittswert:			0,847	0,764	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			69,3	77,0	

b) Bei 33° C Außentemperatur (Abb. 4).
Zustand: normal.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
7. VIII.	148	1170	1,286	2,423	fliegend
9. VIII.	156	1200	1,229	2,563	„
12. VIII.	165	1290	1,248	2,132	„
14. VIII.	173	1300	1,173	2,100	„
16. VIII.	181	1360	1,173	2,015	„
18. VIII.	185	1420	1,254	2,000	„
21. VIII.	197	1430	1,087	2,112	„
26. VIII.	216	1500	1,073	2,377	„
2. IX.	238	1560	1,029	2,282	„
Normaldurchschnittswert:			1,172	2,223	

Digitized by Google

Zustand: thyreoidealos.
Datum der Operation: 3. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz Minute
6. IX.	248	1570	1,009	1,981	170
9. IX.	257	1670	0,814	1,617	130
11. IX.	267	1700	0,941	1,512	126—130
13. IX.	272	1710	0,725	1,491	180
16. IX.	280	1780	0,680	1,219	68—135
18. IX.	286	1790	0,667	1,243	98—126
Durchschnittswert:			0,806	1,511	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			68,8	68,0	

Zustand: thyreoidea- und thymuslos.
Datum der Operation: 20. IX. 19.

Datum	Nr. des Versuchs	Körpergewicht d. Tieres in g	Pro kg Körpergewicht u. Stunde abgegeb. Menge CO_2 in g	H_2O in g	Atemfrequenz pro Minute
23. IX.	300	1760	0,679	1,381	140—160
25. IX.	310	1760	0,716	1,364	100—180
27. IX.	315	1770	0,664	1,376	116—120
30. IX.	321	1800	0,683	1,406	160—180
3. X.	328	1820	0,761	1,602	190
6. X.	333	1820	0,761	1,538	160—180
Durchschnittswert:			0,711	1,445	
In % d. Normaldurchschnittswertes:			60,7	65,0	

Respirationsfrequenzen und Rectaltemperaturen.

Allgemein ist zu bemerken, daß die Respirationsfrequenz bei verschiedenen Kaninchen bei Normaltemperatur eine ziemlich schwankende ist, beim einzelnen Tier aber relativ konstant.

Die Zählung der Atemzüge fand während eines Versuches 2—3 mal statt, d. h. nach einer halben Stunde nach Beginn und am Ende, immer dann, wenn die Tiere ruhig dalagen. Dabei wurden folgende Werte gefunden.

Zahl der Atemzüge bei:

		23° C	33° C
Kaninchen	A. I	30—44	fliegend
„	A. II	32—46	„
„	B. II	42—100	„
„	B. III	34—100	„
„	B. IV	23—30	„
„	C. I	27—33	„
„	C. II	32—46	„

Digitized by Google

Der Durchschnitt betrug also bei 23° C Außentemperatur 30—40 Atemzüge pro Minute und es konnte bezüglich der Zahl nach Operation kein nennenswerter Unterschied wahrgenommen werden.

Anders nun bei 33° C Außentemperatur; während Normaltiere ohne Ausnahme schon nach 2—5 Minuten ausgeprägte Hitzepolypnoe, sog. fliegende Atmung (d. h. unzählbar, über 190 pro Minute) aufwiesen, dabei lang ausgestreckt in der Respirationskammer lagen, trat nun bei allen fünf thyreoidektomierten Kaninchen, eine gewisse Zeit nach der Operation eine auffallende Änderung in der Raschheit der Atmung auf, die allerdings verschieden stark ausgeprägt war und einen etwas verschiedenen Verlauf nahm. 4—14 Tage nach der Schilddrüsenwegnahme waren die ersten Erscheinungen einer verlangsamten Respirationsfrequenz wahrnehmbar. Wenn die Atmung am Ende eines Versuches hier und da noch fliegend war, so ging es doch viel länger, meist über eine halbe Stunde, bis sie sich entwickelte und die Tiere erholten sich rasch, sobald sie den Apparat verlassen hatten. Noch nach einer halben Stunde Aufenthalt im Respirationskasten hatten Tiere Atemfrequenzen von 34—50—60 pro Minute, nach einstündigem Versuch war sie meist auf 160—180 gestiegen, eventuell auch wieder fliegend geworden. Die tiefsten diesbezüglichen Zahlen weisen auf Kaninchen B. IV mit 66, C. II mit 115, A. II mit 120 und A. I mit 150 (Abb. 18—21).

Diese frappante Verminderung der Zahl der Atemzüge bei hoher Außentemperatur dauerte bei Kaninchen B. IV noch nach 70 Tagen nach der Operation an, wo es nach 60 Minuten während dem Versuch Werte von 112 resp. 145 aufwies. Auch bei sämtlichen anderen Tieren war dieser Rückgang in der Zahl der Atemzüge mit Unterbruch von einzelnen Tagen und da auch nur in einer früher einsetzenden beschleunigten Respiration bis zu den Schlußversuchen immer vorhanden.

Sicher ist dieses Phänomen auf Thyreoidektomie zurückzuführen, ob auch die Thymektomie einen kleinen Anteil daran hat, ist nicht ohne weiteres auszuschließen; ein einziges Tier, B. IV, hat auf Thymusausschaltung einmal eine Respirationsfrequenz nach stündigem Versuch von 170 aufgewiesen. Ob gestützt auf diese einzige Beobachtung aber dem Ausfall der Thymus eine Mitbeteiligung am Phänomen beizumessen ist, bleibt fraglich. Aus dem aber in verschiedenen Beziehungen z. T. nachgewiesenen, z. T. nur behaupteten funktionellen Zusammenhang der beiden Organe ist eine gewisse Mithilfe nicht von vornherein von der Hand zu weisen.

Gesetzmäßige Folge ist, daß Kaninchen nach vollständiger Thyreoidektomie und Thyreoithymektomie bei 33° C Außentemperatur mit einer Abnahme der Respirationsfrequenz reagieren (Abb. 18—21), oder in weniger ausgesprochenen Fällen zum mindesten eine viel längere Zeit zur Entwicklung der Hitzepolypnoe brauchen (Abb. 22; die Kurven b u. c stammen vom Kaninchen A. I, thyreoidektomiert und thymektomiert aufgenommen, während Versuch 358 u. 362).

Ob dieses Phänomen auf einer verminderten Erregbarkeit des Atemzentrums, d. h. auf nervöser Grundlage oder auf einer geringeren Wärme-

Digitized by Google

produktion oder auf gesteigerter Wärmeabgabe beruht, darüber können die an den betreffenden Tieren vor und nach dem jeweiligen Versuch aufgenommenen Rectaltemperaturen vielleicht etwelchen Aufschluß geben; die Frage wird aber auf calorimetrischem Wege oder durch Untersuchungen am Atem- und Wärmezentrum selbst ihre endgültige Lösung erfahren.

Zusammenstellung der Rectaltemperaturen bei 33° C. Außentemperaturen vor und nach dem Versuch gemessen.

1. Thymektomierte Tiere:

Kaninchen B. II: normal.

Nr. des Versuchs	Rectaltemperatur vor d. Versuch	Rectaltemperatur nach d. Versuch	Diff.	Resp.-Frequ.
199	39,4	40,3	0,9	fliegend
208	39,7	40,5	0,8	"
220	39,7	40,5	0,8	"
231	39,5	40,3	0,8	"
247	40,0	41,0	1,0	"
259	39,9	40,7	0,8	"

Zustand: thymuslos.

Nr. des Versuchs	Rectaltemperatur vor d. Versuch	Rectaltemperatur nach d. Versuch	Diff.	Resp.-Frequ.
278	39,9	40,7	0,8	fliegend
289	39,9	40,5	0,6	"
299	39,9	41,5	1,6	"

B. III: normal.

Nr. des Versuchs	Rectaltemperatur vor d. Versuch	Rectaltemperatur nach d. Versuch	Diff.	Resp.-Frequ.
274	39,6	40,3	0,7	fliegend
282	39,4	40,7	1,3	"
288	39,3	40,5	1,2	"
294	39,5	40,9	1,4	"

thymuslos.

Nr. des Versuchs	Rectaltemperatur vor d. Versuch	Rectaltemperatur nach d. Versuch	Diff.	Resp.-Frequ.
302	39,6	40,8	1,2	fliegend
309	39,5	40,7	1,2	"
317	39,3	40,5	1,2	"
363	39,5	40,7	1,2	"
330	39,6	40,8	1,2	"
335	39,5	40,5	1,0	"
339	39,4	40,4	1,0	"

Digitized by Google

2. Thyreo-thymektomierte Tiere.

Kaninchen B. IV: thymus- und thyreoidealos.

Nr. des Versuchs	Rectaltemperatur vor d. Versuch	nach d. Versuch	Diff.	Resp.-Frequ.
346	38,6	39,5	0,9	112
353	38,7	39,6	0,9	145

Kaninchen C. I: thyreoidea- und thymuslos.

Nr. des Versuchs	Rectaltemperatur vor d. Versuch	nach d. Versuch	Diff.	Resp.-Frequ.
187	38,7	39,5	0,8	140
217	39,1	39,4	0,3	190

Kaninchen C. II: thyreoidea- und thymuslos.

Nr. des Versuchs	Rectaltemperatur vor d. Versuch	nach d. Versuch	Diff.	Resp.-Frequ.
186	40,0	40,6	0,6	190
198	39,3	39,8	0,5	80—120
206	39,7	40,0	0,3	180
221	38,9	39,8	0,9	140
237	39,1	39,8	0,5	160
251	39,0	39,8	0,8	90—115

Kaninchen A. I: normal.

Nr. des Versuchs	Rectaltemperatur vor d. Versuch	nach d. Versuch	Diff.	Resp.-Frequ.
201	39,4	40,1	0,7	fliegend
205	39,4	40,3	0,9	„
229	39,3	40,1	0,8	„
239	39,3	40,4	1,1	„

thyreoidealos.

Nr. des Versuchs	Rectaltemperatur vor d. Versuch	nach d. Versuch	Diff.	Resp.-Frequ.
249	39,4	40,0	0,6	fliegend
258	39,4	40,0	0,6	180
266	39,7	40,0	0,3	120—150
273	39,6	39,7	0,1	100—180
281	39,4	39,7	0,3	160—180
287	39,3	39,7	0,4	125—185
295	39,2	39,7	0,5	56—185

Digitized by Google

thyreoidea- und thymuslos.

Nr. des Versuchs	Rectaltemperatur vor d. Versuch	nach d. Versuch	Diff.	Resp.-Frequ.
301	39,4	39,8	0,4	96—190
307	39,0	39,6	0,6	66—180
316	39,2	39,7	0,5	180
322	39,0	39,5	0,5	48—180
349	38,5	39,8	1,3	116—fliegend
334	39,3	39,8	0,5	60—190
338	39,1	40,1	1,0	fliegend
345	39,1	40,0	0,9	60—180
352	38,7	40,4	1,7	58—180

Kaninchen A. II: normal.

Nr. des Versuchs	Rectaltemperatur vor d. Versuch	nach d. Versuch	Diff.	Resp.-Frequ.
185	39,5	41,3	1,8	fliegend
197	39,6	40,6	1,0	"
216	39,5	41,4	1,9	"
238	39,3	40,6	1,3	"

thyreoidealos.

Nr. des Versuchs	Rectaltemperatur vor d. Versuch	nach d. Versuch	Diff.	Resp.-Frequ.
248	39,7	40,8	1,1	170
267	39,9	40,5	0,6	126—180
272	39,7	40,3	0,6	180
280	39,7	40,2	0,5	68—135
286	39,5	40,1	0,6	98—126

thyreoidea- und thymuslos.

Nr. des Versuchs	Rectaltemperatur vor d. Versuch	nach d. Versuch	Diff.	Resp.-Frequ.
300	39,5	40,6	0,9	140—160
310	39,2	40,0	0,8	100—180
315	39,2	40,5	1,3	116—120
321	39,0	39,9	0,9	160—180
328	39,4	40,1	0,7	190
333	38,3	39,3	1,0	160—180

Durchschnitte.

1. Zustand: normal.

Kaninchen	Rectaltemperatur vor d. Versuch	nach d. Versuch	Differenz
B. II	39,7	40,55	0,85
B. III	39,45	40,6	1,15
A. I	39,35	40,22	0,87
A. II	39,48	40,98	1,5

Digitized by Google

2. Zustand: thymuslos.

Kaninchen	Rectaltemperatur vor d. Versuch	Rectaltemperatur nach d. Versuch	Differenz
B. II	39,9	40,9	1,0
B. III	39,49	40,63	1,14

3. Zustand: thyreoidealos.

Kaninchen	Rectaltemperatur vor d. Versuch	Rectaltemperatur nach d. Versuch	Differenz
A. I	39,43	39,83	0,4
A. II	39,7	40,38	0,68

4. Zustand: thymus- und thyreoidealos.

Kaninchen	Rectaltemperatur vor d. Versuch	Rectaltemperatur nach d. Versuch	Differenz
A. I	39,03	39,85	0,82
A. II	39,1	40,03	0,93
B. IV	38,65	39,55	0,9
C. I	38,9	39,45	0,55
C. II	39,33	39,93	0,6

Aus obigen Zusammenstellungen lassen sich folgende Tatsachen feststellen:

1. Alle Normaltiere haben vor dem Versuch eine durchschnittliche Rectaltemperatur von 39,5° C, sie steigt nach stündigem Versuch bei 33° C auf ca. 40,5° C, d. h. um 1°.

2. Thymektomierte Tiere weisen vor und nach der Operation gleiche Temperaturen, wie normal, folglich auch gleiche Differenzen auf.

3. Thyreoidealose Tiere zeigen nach dem Versuch um 0,4 resp. 0,6° C kleinere Durchschnittswerte als normal, die Differenz ist um mehr als die Hälfte des Normalen gesunken.

4. Bei allen thyreo-thymektomierten Tieren sind die Durchschnittstemperaturen tiefer, sowohl vor als auch nach dem Versuch, wo alle unter 40,0° C sind.

Große Schlüsse können aus diesen Wärmemessungen nicht gezogen werden, indem bei sich sträubenden Tieren, mit Rücksicht auf die eigentliche Aufgabe der Arbeit systematische Messungen nicht vorgenommen werden konnten. Immerhin seien die Tabellen angegeben und lassen vielleicht im Verein mit anderen diesbezüglichen Untersuchungen doch noch eine Bewertung zu.

Digitized by Google

So wie die Sache gegenwärtig steht, möchte ich zur Erklärung des Respirationsphänomens in Kombination mit den Ergebnissen der Wärmemessung, die Möglichkeit einer gesteigerten Wärmeabgabe und daraus sich ergebender geringerer Erwärmung des Organismus, was seinerseits wieder einen schwächeren Reiz für das Atemzentrum bilden würde, von vornherein außer Betracht lassen. Ein Temperaturunterschied von 0,5° kann kaum eine solch hochgradige Atemfrequenzänderung hervorrufen. Zudem ist die vermehrte Wärmeabgabe aus folgender Überlegung auszuschließen. Die Wärmeabgabe beim Kaninchen vollzieht sich, da dieses Tier bekanntlich nicht Schweiß absondern kann, im wesentlichen durch die Atmung, d. h. durch die Wasserabgabe. Diese ist aber, wie aus den Versuchen deutlich ersichtlich, nach Thyreoidektomie stark reduziert, ein großer Calorienverlust auf diesem Wege folglich ausgeschlossen. Auch an eine mächtige Weitung der peripheren Gefäße, verbunden mit großem Wärmeverlust, ist hier schwerlich zu denken.

Vielmehr bleibt die Möglichkeit einer nervösen Beeinflussung d. h. einer abgeschwächten Erregbarkeit des Atemzentrums, wahrscheinlich.

Sehr plausibel ist übrigens auch, nach den allgemein auf Thyreo-Thymektomie gesunkenen Temperaturen geschlossen, die Annahme der verminderten Wärmeproduktion; die beiden Faktoren, geringe Kohlensäureabgabe und gesunkene Mastdarmtemperatur stimmen noch am besten überein. Maßgebend wird aber erst eine Untersuchung am Wärmezentrum selbst sein.

Die Resultate.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können im folgenden kurz zusammengefaßt werden:

1. Kaninchen sind für Stoffwechseluntersuchungen nicht ungeeignete Tiere; sie ertragen Thyreoidektomie und Thymektomie sehr gut.

2. Kaninchen reagieren auf Thyreoidektomie mit einer starken Abnahme der Kohlensäure- und Wasserabgabe.

3. Auf bloße Thymektomie zeigen sich Kaninchen in bezug auf CO_2 und H_2O-Abgabe sozusagen refraktär; es tritt nur eine kleine Verminderung ein.

4. Gleichzeitige Schilddrüsen- und Thymusexstirpation hat

Digitized by Google

eine sehr starke Abnahme der Kohlensäure und Wasserabgabe zur Folge, ein Abklingen der Reaktion tritt nicht ein.

5. Thyreoidektomie nach Thymektomie löst eine markante Abnahme der Kohlensäure und Wasserausscheidung aus; die tiefen Werte bleiben konstant.

6. Thymektomie nach Thyreoidektomie kann keine erneute Senkung hervorrufen; wohl aber verhindert sie das Abklingen der Reaktion, wie sie nach Schilddrüsenwegnahme allein auftritt.

7. Diese Tatsachen sind die ersten experimentellen Beweise, daß Thymus und Thyreoidea in ihrer Funktion in gegenseitig förderndem Verhältnis stehen. Das gilt vorläufig für das Kaninchen. Falls diese Befunde verallgemeinert werden dürfen, haben sie nicht nur große Bedeutung für die Physiologie, sondern auch für die Pathologie, speziell die ganze Basedow-Lehre.

8. Schilddrüsenlose und schilddrüsen- und thymuslose Kaninchen zeigen bei erhöhter Außentemperatur (33 ° C) eine wesentliche Abnahme der Respirationsfrequenz; die Hitzepolypnoe stellt sich oft erst nach einer Stunde ein, oft überhaupt nicht, d. h. die Tiere sind gegen hohe Wärmegrade viel weniger empfindlich.

Literatur.

[1]) Danoff, Der Einfluß der Milz auf den respiratorischen Stoffwechsel. Diese Zeitschr. 93, H. 1 u. 2. — [2]) Hauri, Das Verhalten der Kohlensäure und Wasserausscheidung des schilddrüsen- und milzlosen Kaninchens bei normaler und erhöhter Außentemperatur. Diese Zeitschr. Bd. 98, H. 1, 2 u. 3. 1919. — [3]) Boldyreff, zit. nach Hauri. — [4]) Friedleben, Die Physiologie der Thymusdrüse in Gesundheit und Krankheit vom Standpunkte experimenteller Erforschung und klinischer Erfahrung. Frankfurt 1858. — [5]) Matti, Physiologie und Pathologie der Thymusdrüse. Berlin 1913. — [6]) Basch, zit. nach Matti. — [7]) J. Haldane, A new form of Apparatus for measuring the Respiratory Exchange of Animals. Journ. of physiol. 12, 419. — [8]) Krause, Die Anatomie des Kaninchens. Leipzig 1884. — [9]) Klose und Vogt, Klinik und Biologie der Thymusdrüse. Beitr. z. klin. Chir. 79. 1910. Zit. nach Matti. — [10]) Söderlund und Backmann, Studien über die Thymusinvolution. Die Altersveränderungen der Thymusdrüse beim Kaninchen. Arch. f. mikr. Anat. 73. 1909. Zit. nach Matti. — [11]) Groschuff, zit. nach Matti.

Digitized by Google

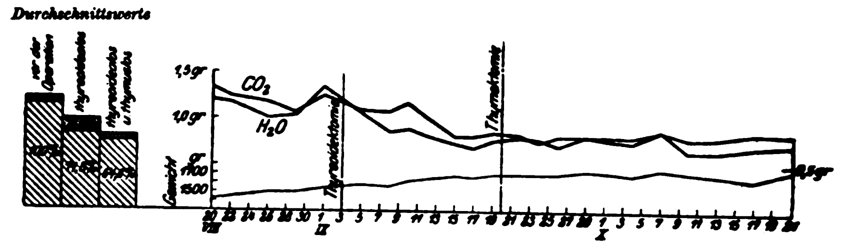


Abb. 1. **Kaninchen A. I, thyreoidektomiert und thymektomiert bei 25° C.**

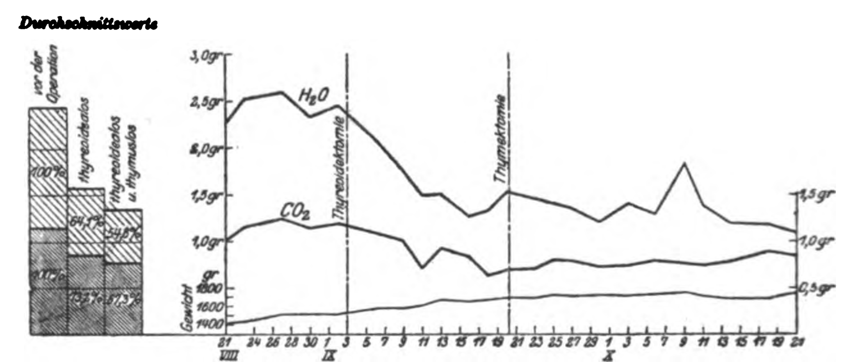


Abb. 2. **Kaninchen A. I, thyreoidektomiert und thymektomiert bei 33° C.**

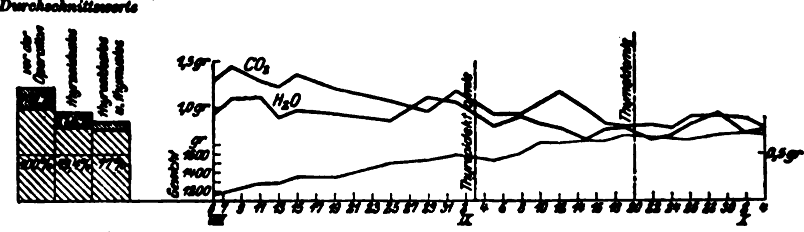


Abb. 3. **Kaninchen A. II, thyreoidektomiert und thymektomiert bei 28° C.**

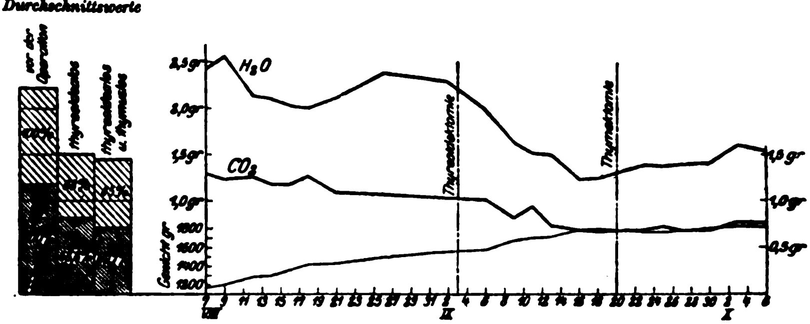


Abb. 4. **Kaninchen A. II, thyreoidektomiert und thymektomiert bei 33° C.**

Digitized by Google

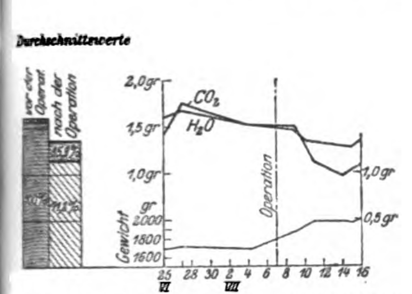


Abb. 5. Kaninchen B. I, thymektomiert bei 23° C.

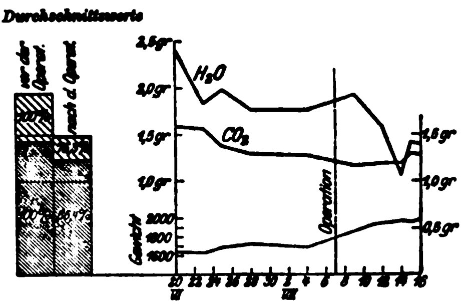


Abb. 6. Kaninchen B. I, thymektomiert bei 27° C.

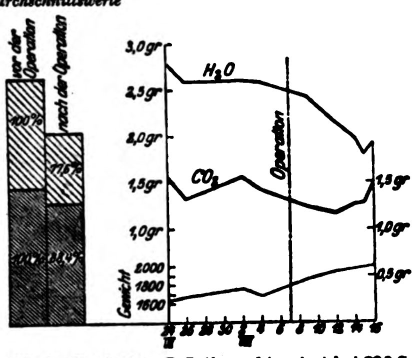


Abb. 7. Kaninchen B. I, thymektomiert bei 33° C.



Abb. 8. Kaninchen B. II, thymektomiert bei 25° C.

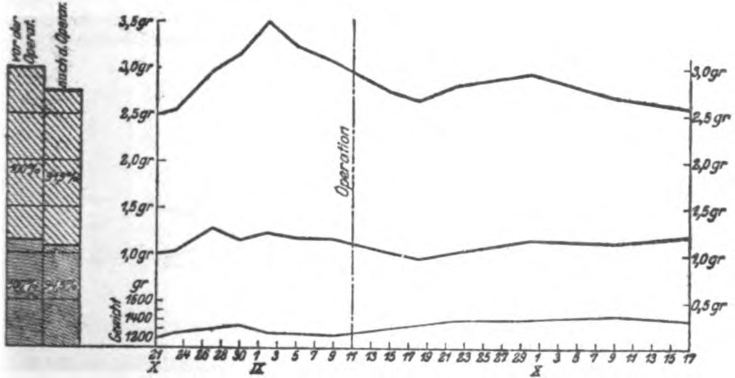


Abb. 9. Kaninchen B. II, thymektomiert bei 33° C.

Digitized by Google

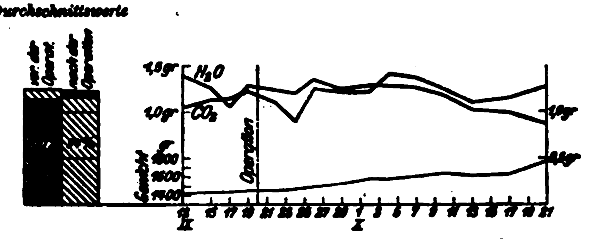


Abb. 10. Kaninchen B. III, thymektomiert bei 28° C.

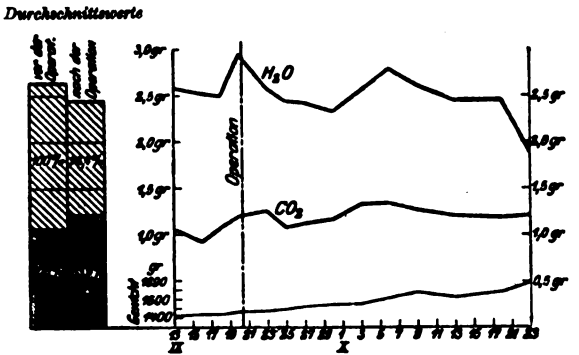


Abb. 11. Kaninchen B. III, thymektomiert bei 33° C.

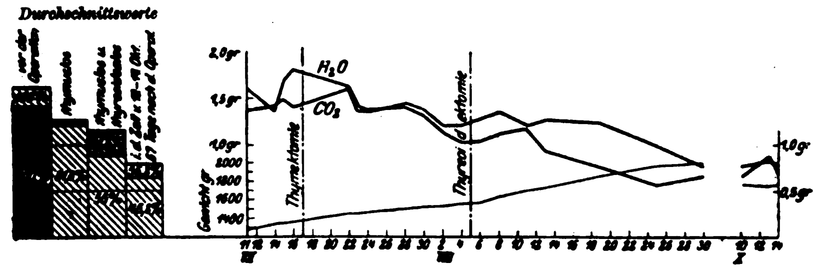


Abb. 12. Kaninchen B. IV, thymektomiert und thyreoidektomiert bei 28° C.

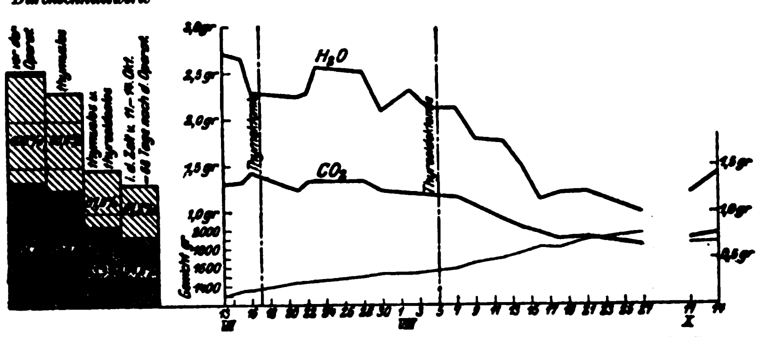


Abb. 13. Kaninchen B. IV, thymektomiert und thyreoidektomiert bei 33° C.

Digitized by Google



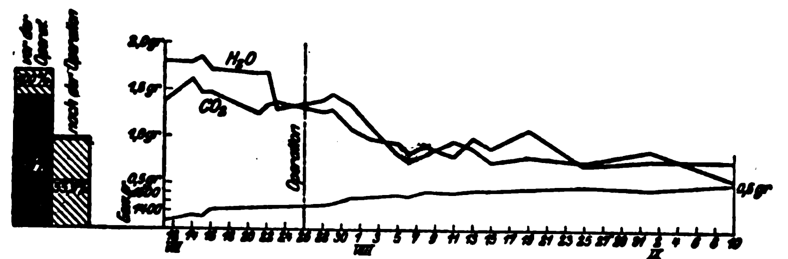


Abb. 14. Kaninchen C. I, thymektomiert und thyreoidektomiert bei 28° C.

Durchschnittswerte

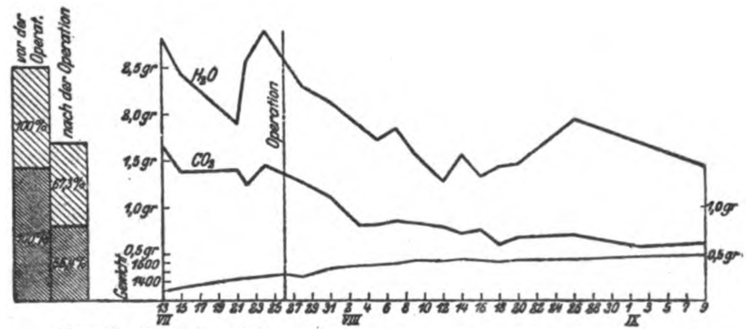


Abb. 15. Kaninchen C. I, thymektomiert und thyreoidektomiert bei 33° C.

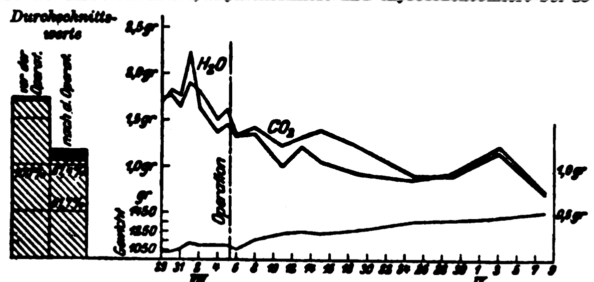


Abb. 16. Kaninchen C. II, thymektomiert und thyreoidektomiert bei 28° C.

Durchschnittswerte

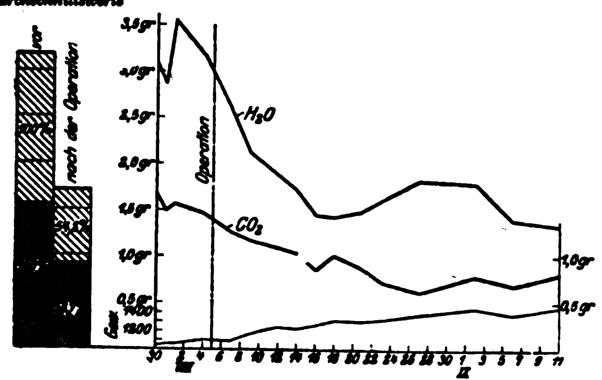


Abb. 17. Kaninchen C. II, thymektomiert und thyreoidektomiert bei 33° C.

Digitized by Google

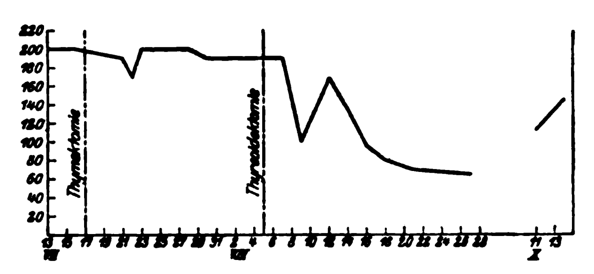


Abb. 18. Respirationsfrequenz. Kaninchen B. IV, thymektomiert und thyreoidektomiert bei 33° C.

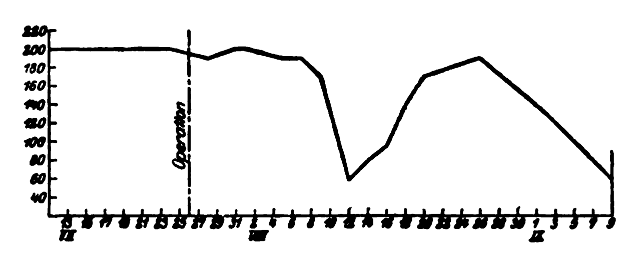


Abb. 19. Respirationsfrequenz. Kaninchen C. I, thymektomiert und thyreoidektomiert bei 33° C.



Abb. 20. Respirationsfrequenz. Kaninchen C. II, thymektomiert und thyreoidektomiert bei 33° C.

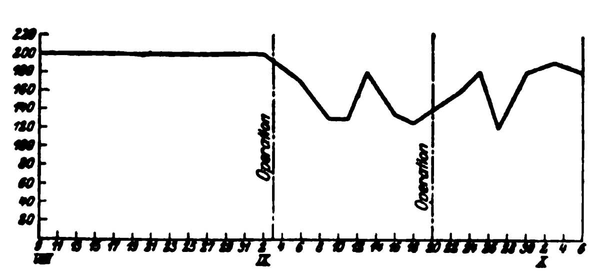


Abb. 21. Respirationsfrequenz. Kaninchen A. II, thyreoidektomiert und thymektomiert bei 33° C.

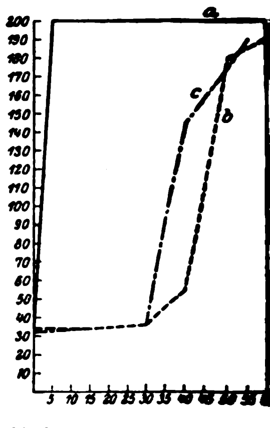


Abb. 22. Veränderung der Respi rationsfrequenz im Laufe eine Stunde bei 33° C Außentempera tur. a) Normaltier, b) und c) thy mus und thyreoidealos Tier.

Zur Methodik der Neutralschwefelbestimmung im Harn.

Von

Paul Liebesny.

(Aus dem physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 5. Februar 1920.)

Gelegentlich einer Arbeit, welche den Einfluß des Lichtes auf den intermediären Eiweißstoffwechsel zum Gegenstande hatte[1]), ergab sich die Notwendigkeit, eine größere Serie von Neutralschwefelbestimmungen im Harn vorzunehmen. Diese Bestimmungen sollten auf titrimetrischen Wege aus der Differenz von Gesamtschwefel und Gesamtsulfaten teils nach den Angaben von Raiziss und Dubin[2]), teils nach Rosenheim und Drummond[3]) ausgeführt werden, wobei die Schwefelsäure als sehr schwer lösliches Benzidinsulfat niedergeschlagen wird.

Um die Sicherheit zu haben, daß mit der Benzidinsulfatmethode obiger Autoren genaue Resultate zu erzielen sind, habe ich vor Ausführung der Harnuntersuchungen zunächst Schwefelbestimmungen in 1 proz. Sulfosalicylsäurelösungen vorgenommen. Bei acht derartigen Untersuchungen ergaben sich stets Schwefelwerte, welche die berechneten um 8—10% überstiegen. Trotz Aufwendung der größten Sorgfalt schienen diese Ungenauigkeiten unvermeidlich.

Die zu hohen Schwefelwerte wurden von Professor Durig auf den Schwefelgehalt des Leuchtgases zurückgeführt, da er schon vor mehreren Jahren anläßlich von Schwefelbestimmungen ähnliche Störungen durch den Leuchtgasschwefel des Wiener Leuchtgases gefunden hatte. Er nahm daher an, daß bei den vorliegenden Untersuchungen, bei welchen nach der Methodik

[1]) Liebesny, Der Einfluß des Lichtes auf den intermediären Eiweißstoffwechsel. Erscheint in der Monatsschr. f. physik. u. diät. Therapie 1920.

[2]) Raiziss und Dubin, Journ. of Biolog. Chem. 18, 297. 1914.

[3]) Rosenheim und Drummond, Biochemical Journ. 8, 143. 1914.

Digitized by Google

der obengenannten Autoren die auf Schwefel zu untersuchenden Flüssigkeiten in offenem Schälchen über der Gasflamme verdampft und geglüht werden müssen, der Leuchtgasschwefel die Lösungen verunreinige. Diese Vermutung hat sich in der Folge als richtig erwiesen.

Es war also notwendig, das Leuchtgas bei diesen Analysen zu vermeiden. Die Schwefelbestimmungen im Harn wurden nun in folgender modifizierter Weise vorgenommen, nachdem Kontrollversuche mit 1 proz. Sulfosalicylsäure Werte ergaben, welche mit den berechneten fast vollständig übereinstimmten; es ergab z. B. die Bestimmung von 1 proz. Sulfosalicylsäure in 1 ccm 0,00143 g S, im Kontrollversuch 0,0014 g S; der berechnete Wert ist 0,00146 g S.

A. Gesamtschwefelbestimmung im Harn.

2 ccm Harn werden in eine Eprouvette aus schwer schmelzbarem Glas von 48 ccm Inhalt gebracht und mit 5 ccm des von Denis[1]) modifiziertes Benediktschen Reagens[2]) versetzt; das Reagens hat folgende Zusammensetzung:

25 g Kupfernitrat[3]),
25 g Kochsalz,
10 g Ammoniumnitrat,
1000 g dest. Wasser.

Die Eprouvette wird in einen fast senkrecht gestellten elektrischen Verbrennungsofen (System Heräus) gebracht, an der in der Mitte desselben befindlichen Auflageschiene mit einer Klemme befestigt, und zwar so, daß zunächst nur die Kuppe der Eprouvette in den Anfangsteil des Rohres des Heräusofens hineinragt, worauf der Ofen zunächst mit geringer Stromintensität erhitzt wird, um ein langsames Abdampfen der Flüssigkeit zu erzielen; allzu rasches Erhitzen bewirkt Stoßen und eventuelles Herausspritzen der Flüssigkeit; es empfiehlt sich überdies, um dieses Stoßen mit Sicherheit zu vermeiden, eine kleine Glas-

[1]) Denis, Journ. of Biolog. Chem. 8, 401. 1910.

[2]) Benedikt, Journ. of Biolog. Chem. 6, 363. 1909.

[3]) Benedikt gab schon an, daß ein Kontrollversuch mit dieser Lösung ausgeführt werden muß, da Kupfernitrat gewöhnlich Spuren von Sulfat enthält; dies traf auch bei diesen Untersuchungen zu, obgleich sogenanntes chemisch reines Kupfernitrat von Merck verwendet wurde. Die Menge der in dieser Lösung gefundenen Sulfate muß vom Endwert abgezogen werden.

Digitized by Google

perle der Lösung zuzusetzen. Die Abdampfung der Flüssigkeit bis zur Trockene läßt sich auf diese Weise in zirka 30 Minuten ausführen. Nach der Verdampfung der Flüssigkeit wird die Eprouvette mit der Kuppe bis zur Mitte des Heräusofens eingeschoben und nun die volle Stromstärke eingeschaltet; nach zirka 2 Minuten befindet sich die untere Hälfte der Eprouvette samt Inhalt in Rotglut und man glüht so durch 10 Minuten.

Diese Art von Verbrennung hat sich sehr bewährt, erstens wegen des vollständigen Ausschlusses der Möglichkeit der Verunreinigung durch Leuchtgasschwefel. Außerdem erfordert das Verdampfenlassen und später das Glühen in offenem Schälchen über einer Flamme, ständige Aufmerksamkeit und Beobachtung, während dieselben Manipulationen keinerlei Beaufsichtigung benötigen, wenn sie in der geschilderten Weise in einer Eprouvette im Heräusofen ausgeführt werden, wodurch Zeit und Mühe gespart wird. Es dürfte sich daher diese Methodik des Verdampfens von Flüssigkeiten und das Glühen des Verdampfungsrückstandes auch bei anderen analytischen Untersuchungen bewähren, insbesondere dort, wo kleine Mengen zur Untersuchung gelangen.

In Fortsetzung der besprochenen Untersuchung wird die Eprouvette abkühlen gelassen, dann setzt man 2 ccm 10 proz. Salzsäure zu und erwärmt ganz wenig, worauf sich der Verbrennungsrückstand vollständig klar löst. Nun wird mit 10% Natronlauge sorgfältig neutralisiert und dann bis zur schwach sauren Reaktion (geprüft mit Kongorotpapier) wieder angesäuert; hernach setzt man immer noch in der gleichen Eprouvette 25 ccm der von Raiziss und Dubin angegebenen Benzidinlösung zu; diese besteht aus:

6,7 g Benzidin,
29 g Salzsäure (spez. Gewicht 1,19),
1000 g dest. Wasser.

Es bildet sich rasch ein silberglänzender Niederschlag, der nach 10 Minuten vollständig gefällt ist. Hierauf wird der Niederschlag auf einem gehärteten Filter (Schleicher und Schüll) unter äußerst geringer Saugwirkung filtriert; bei zu starkem Saugen geht der Niederschlag eventuell durch das Filter. Der Niederschlag muß reichlich mit dest. Wasser und sorgfältig nachgewaschen werden, und zwar bis zur neutralen Reaktion der aus dem Trichter abtropfenden Flüssigkeit.

Digitized by Google

Bei dieser Art der Filtration des Niederschlages bin ich auch von den Vorschlägen von Raiziss und Dubin abgegangen, welche die Filtration auf einem Asbestfilter im Goochtiegel vornehmen. Dabei ist es notwendig, den Asbest vorher stets sorgfältig zu reinigen und im Goochtiegel zu glühen, was einen nicht geringen Zeitaufwand erfordert. Es ist daher das Filtrieren mit Trichter und gehärtetem Papier bei diesen Untersuchungen aus dem besprochenen und einem noch weiter unten zu besprechenden Grund vorzuziehen. Der Niederschlag samt Papierfilter wird in einen 250 ccm fassenden, weithalsigen Erlenmeyerkolben gebracht, mit zirka 150 ccm dest. Wasser aufgeschwemmt, ungefähr 5 Minuten gekocht und in heißem Zustand nach Hinzufügen von einigen Tropfen alkoholischer Phenolphthaleinlösung mit $^n/_{10}$-Natronlauge titriert. Bei der Durchführung der Endreaktion hat sich auch die Verwendung von gehärtetem Papierfilter statt Asbest bei der vorhergehenden Filtration empfehlenswert erwiesen, da der in der Flüssigkeit herumschwimmende Asbest die Beobachtung des Farbenumschlages erschwert.

Es sei noch erwähnt, daß bei Harnen mit sehr niedrigem Schwefelgehalt die Titration mit $^n/_{100}$-Natronlauge vorgenommen werden müßte. 1 ccm $^n/_{10}$-NaOH entspricht 0,0049 H_2SO_4.

B. Bestimmung der Gesamtsulfate.

Bei dieser Bestimmung wurde im wesentlichen nach der von Rosenheim und Drummond angegebenen Methodik vorgegangen.

25 ccm Harn wurden in einen zirka 250 ccm fassenden weithalsigen Erlenmeyerkolben gebracht, mit 20 ccm 10 proz. Salzsäure versetzt und während 20 bis 30 Minuten langsam auf kleiner Flamme gekocht. Nach dem Kochen wird sorgfältig neutralisiert und dann wieder bis zur schwach sauren Reaktion angesäuert; nun werden 100 ccm folgender Benzidinlösung zugesetzt:

4 g Benzidin,
5 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,19)
auf 2000 ccm dest. Wasser.

Man läßt wieder 10 Minuten stehen, führt die Filtration wie oben auf gehärtetem Papierfilter aus und bringt Niederschlag samt Filter in einen Erlenmeyerkolben. Die Fortsetzung der Bestimmung erfolgt in gleicher Weise wie bei der Gesamtschwefelbestimmung.

Digitized by Google

Die nach dieser Methodik aus der Differenz von Gesamtschwefel und Gesamtsulfaten an zwei Hunden in Vorversuchen gewonnenen Neutralschwefelwerte seien in folgendem angegeben. Die Tiere wurden in Stoffwechselkäfigen gehalten und mit fast ausschließlicher Eiweißkost, nämlich Darmgekröse von Pferden ernährt.

Der erste Hund hatte ein Körpergewicht von 13,2 kg und wurde täglich mit 750 g Darmgekröse ernährt. Der Stickstoffgehalt dieser Nahrung war durchschnittlich 10,82 g und der Kaloriengehalt 648,47 Kalorien.

Gewöhnlich wurde die 24stündige Harnmenge manchmal auch Mischharne von 2 Tagen untersucht.

Es ergaben sich folgende Werte:

Tabelle I.

Datum	Harnmenge	Ges.-Stickstoff	Neutralschwefel als SO_3
26. VI. 1919	150	4,6914	0,1506
27. VI.	260	7,6622	0,3296
28. VI.	335	11,0543	0,3307
29. VI.	260[1])	8,68504	0,3546
30. VI.	260[1])	8,68504	0,3546
1. VII.	225	9,6195	0,3381
3. VII.	225	10,1556	0,3393
4. VII.	240	10,3891	0,3485
5. VII.	215	7,2270	0,3302

Der zweite Hund hatte ein Körpergewicht von 5,4 kg und wurde mit 400 g Darmgekröse täglich ernährt, welcher Nahrungsmenge durchschnittlich 6,172 g Stickstoff und 356,7 Kalorien entsprachen.

Bei diesem Tier ergaben sich folgende Werte:

Tabelle II.

Datum	Harnmenge	Ges.-Stickstoff	Neutralschwefel als SO_3
14. X.	220	6,2528	0,264
15. X.	250	7,8505	0,275
16. X.	145	4,9369	0,2581
17. X.	175	5,8403	0,2548
18. X.	160	5,8777	0,2592
19. X.	120[1])	5,8060	0,2655
20. X.	120[1])	5,8060	0,2655
21. X.	135	6,7171	0,2770

[1]) Mischharne.

Digitized by Google

Die Neutralschwefelwerte zeigten in beiden Versuchsreihen eine große Konstanz.

Mit den vorgeschlagenen technischen Abänderungen ermöglicht die Benzidinsulfatmethode eine sehr expeditive und genaue Bestimmung des Neutralschwefels im Harn und dürfte sich auch im klinischen Betrieb bewähren. Der Neutralschwefel entbehrt, wie die Untersuchungen von Weiss[1]) gezeigt haben, nicht des klinischen Interesses; jedoch konnte sich dessen Bestimmung auf Kliniken bisher offenbar deshalb nicht einbürgern, da die bisher üblichen gewichtsanalytischen Methoden der Schwefelbestimmung im Harn sehr umständlich und zeitraubend waren. Zum Schlusse danke ich Herrn Professor Dr. Otto Fürth für die kollegiale Unterstützung, die er mir bei meinen Untersuchungen angedeihen ließ, auf das wärmste.

[1]) Weiss, Diese Zeitschr. 27. 134. 1910.

Digitized by Google

Über einen neuen hämatinartigen krystallisierten Körper.

Von

S. Partos.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Budapest. [Direktor Paul Hári].)

(*Eingegangen am 4. Februar 1920.*)

Mit 1 Abbildung im Text.

Gelegentlich der Untersuchungen, die im obengenannten Institute über die verschiedenen Hämatine im Gange sind, ist es mir gelungen, sowohl aus Blut wie auch aus Hämoglobin Krystalle in nicht allzu geringer Ausbeute zu erhalten, deren Darstellung und Eigenschaften nachfolgend beschrieben seien. Die Darstellung beruht auf einer Kombination der Verfahren von Piettre und Vila[1]) einerseits, Cazeneuve und Breteau[2]) andererseits. Defibriniertes Blut wird mit normalen, schwefelsaurem Natrium bis zu einem Gehalt von 1% versetzt und in der Hitze koaguliert, das Koagulum ausgepreßt, mit heißem Wasser gewaschen und wiederum ausgepreßt, zerrieben und mit der doppelten Menge — als Blut vorhanden war — 92 proz. Methylalkohol, der 3% Ameisensäure enthält, in der Kälte extrahiert. Der filtrierte, ganz klare, dunkel rotbraune Auszug wird in einem Becherglas am nicht allzu heißen Wasserbad zunächst so lange erhitzt, bis sich die Flüssigkeit durch Bildung kleinster, mikroskopischer Krystalle trübt, und dann noch so lange, bis die Krystalle (an einem herausgenommenen Tropfen unter dem Mikroskop geprüft) an Größe nicht mehr zunehmen. Dies ist in der Regel nach $^1/_2$—1 Stunde lang der Fall. Dann läßt man 12 Stunden lang

[1]) M. Piettre et Vila, Le hematine cristallisé. Compt. rend. de l'Acad. des Sc. **141**, 1041. 1906.

[2]) P. Cazeneuve et B. Breteau, Compt. rend. de l'Acad. des Sc. **128**, 678. 1899.

Digitized by Google

in der Kälte stehen, nach welcher Zeit sich die Krystalle am Boden des Becherglases in Form eines feinen, schwarzen Pulvers angesammelt haben. Der größte Teil der darüberstehenden kaum gefärbten Flüssigkeit wird durch Dekantieren entfernt, der Rest mitsamt dem aufgeschwemmten Pulver filtriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet.

Alles dies geht ganz glatt vonstatten, vorausgesetzt, daß die Koagulation des Blutes eine vollkommene gewesen ist. War dies nicht der Fall, so erhält man mit dem säurehaltigen Alkohol einen Auszug, der einer dünneren oder dickeren Gallerte (Acidalbuminat?) gleicht, wobei wohl Krystalle wie sonst sich bilden, jedoch durch Filtrieren nicht gesondert werden können.

Auf die Menge, Größe der Krystalle, sowie auch ihre Zusammensetzung (s. weiter unter) bleibt es nach einer gewissen Dauer des Erhitzens ohne Einfluß, ob man noch weiter am Wasserbad läßt oder nicht. Desgleichen ist es auch nicht von Belang, ob das Blutkoagulum zur Entfernung der Salze mit heißem Wasser bloß einmal oder wiederholt gewaschen wurde.

Die Ausbeute betrug pro 1 l Blut in 5 Versuchsreihen, in denen ich möglichst quantitativ vorging, 0,30—0,50 g.

Ich versuchte auch die Versuchsbedingungen, unter denen die Krystalle entstehen, zu variieren, indem ich statt Methylalkohol und Ameisensäure: a) Methylalkohol und Oxalsäure; b) Methylalkohol und Essigsäure, c) Äthylalkohol und Oxalsäure, d) Äthylalkohol und Ameisensäure, verwendete. In keinen dieser Fälle habe ich eine Bildung von Krystallen konstatieren können.

Jeder Versuch einer Umkrystallisierung ist bisher gescheitert; aus der alkalischen Lösung der Krystalle läßt sich zwar ein Farbstoff durch Zusatz von Säure in Form eines braunen voluminösen Niederschlages fällen. Doch ist dieser amorph und nicht mehr in die krystallisierte Form zu bringen.

Physikalische Eigenschaften.

Krystallform: Von einigen Ausnahmefällen abgesehen, wo die Krystalle bis zu 1 mm lange Prismen darstellten, waren sie in der Regel bloß bei mittelstarker Vergrößerung als kurze, schlanke Nadeln wahrzunehmen, die teils einzeln, jede für sich, teils zu Häufchen zusammengeballt im Gesichtsfeld lagen; im letzteren

Digitized by Google

Falle hatte es auf den ersten Blick das Aussehen, als wenn es sich um grobe, amorphe Schollen handelte. Statt der Krystalle fanden sich zuweilen charakteristische Hantelformen vor.

Löslichkeit: Die Krystalle waren unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther, Benzol, Chloroform, Petroläther, desgleichen in verdünntem und konzentriertem Phenol, konzentrierter Essigsäure, rauchender Salzsäure und in Lösungen von kohlensaurem Natrium; wenig löslich in Pyridin, in heißem, saurem Methylalkohol und in konzentriertem Ammoniak; löslich in 2—3 proz. Natron- und Kalilauge, in letzterer weit rascher. Dünne Schichten dieser Lösung sind in durchfallendem Licht olivengrün, dicke Schichten rot.

Lichtabsorption der Lösung. Mit dem Spektroskop untersucht, ist die alkalische Lösung durch einen eigentümlichen Schatten gekennzeichnet, der in Rotgelb gelegen ist; das blaue Ende ist in einigermaßen konzentrierteren Lösungen vollständig verdunkelt.

Die alkalischen Lösungen wurden auch spektrophotometrisch untersucht, und zwar mittels des von Martens und Grünbaum verbesserten Königschen Spektrophotometers, das von P. Hári in seiner jüngsten Mitteilung[1]) verwendet wurde. Um Wiederholung zu vermeiden, verweise ich bezüglich aller Einzelheiten auf diese Mitteilung und will hier bloß erwähnen, daß als Lichtquelle eine sehr lichtstarke Metallfadenlampe verwendet und der Objektivspalt in der Regel 0,1 mm weit genommen wurde. (Bloß bei den Ablesungen in Blau mußte auf 0,3—0,4 mm erweitert werden.)

Der Okularspalt wurde, genau so, wie in Háris erwähnten Versuchen, so weit genommen, daß an der von Hüfner seinerzeit zur Untersuchung des Oxyhämoglobins vorgeschlagenen Stelle des Spektrums der Spektralausschnitt die von Hüfner benutzte Breite aufweise.

Die verschiedenen Präparate wurden in 3 proz. Lauge (bald Kali- bald Natronlauge) gelöst. Die Art der Lösungsmittel hatte keinen Einfluß auf das Ergebnis. Präparate Ia, Ib und V waren aus Pferdeblut, IIa, IIb, III und IV aus Rinderblut bereitet.

[1]) P. Hári, Ist das Absorptionsverhältnis usw. Diese Zeitschr. 95, 266. 1919.

Digitized by Google

Die Lichtabsorption wurde längs des ganzen sichtbaren Spektrums bestimmt, ausgenommen im äußersten Rot sowie in einem großen Teil des blauen Endes des Spektrums, wo die Ablesungen unsicher waren.

Um die Ablesungen quantitativ bewerten zu können, wurden nicht die Absorptionsverhältnisse berechnet, sondern nach Háris Vorgang, die von ihm sog. spezifischen Extinktionskoëffizienten, d. h. die auf 0,1% Konzentration der Farbstofflösung umgerechneten Extinktionskoeffizienten. (Tabelle I.)

Tabelle I.

Spezifische Extinktionskoëffizienten.

(Nr. V aus Pferdeblut, die übrigen aus Rinderblut.)

Spektral-ausschnitt μμ	V Konzentration 0,01518 %	VI Konzentration 0,01612 %	VII Konzentration 0,01612 %	VIII Konzentration 0,01548 %	IX Konzentration 0,00802 %	X Konzentration 0,01329 %	XIII Konzentration 0,01711 %	XV Konzentration 0,0812 %	XVI Konzentration 0,0258 %	XVII Konzentration 0,0240 %	Mittelwerte
677,7—660,3	1,28	1,32	1,19	1,22	—	—	—	—	—	—	1,25
665,8—649,0	1,77	1,77	1,70	1,85	—	—	—	—	—	—	1,77
653,9—638,3	2,53	—	2,58	—	—	—	—	—	—	—	2,55
642,7—628,1	3,86	3,90	3,66	3,62	3,93	3,91	—	—	—	—	3,81
632,5—618,5	5,00	—	—	—	4,90	—	—	—	—	—	4,95
622,7—609,2	5,99	6,02	5,66	5,66	5,92	5,99	—	—	—	—	5,87
613,2—600,7	6,63	6,62	6,30	6,30	6,59	6,66	—	—	—	—	6,51
604,4—592,4	6,87	6,88	6,53	6,46	6,90	6,89	—	—	—	—	6,75
595,9—584,6	6,92	6,97	6,61	6,60	6,83	7,04	7,18	—	—	—	6,89
588,3—577,5	6,98	6,98	6,48	6,64	6,83	7,00	7,11	—	—	—	6,86
580,4—570,5	6,89	6,97	6,58	6,55	6,87	6,86	7,05	—	—	—	6,82
573,5—563,5	6,77	6,69	6,29	6,64	6,75	6,68	7,02	—	—	—	6,66
565,6—556,1	6,54	6,58	6,27	6,36	6,55	6,65	6,66	6,64	—	6,52	6,53
559,6—551,0	6,25	6,36	6,03	6,33	6,42	6,54	—	—	—	—	6,32
553,5—544,8	6,04	6,13	5,84	6,15	6,10	6,07	—	—	—	—	6,06
547,3—539,0	5,99	6,00	5,71	5,90	6,04	6,05	6,00	—	—	—	5,95
541,4—533,7	6,09	6,06	5,72	5,78	6,00	6,08	6,05	6,18	—	6,10	6,01
535,9—528,4	6,32	6,20	5,95	5,79	6,20	6,35	—	—	—	—	6,14
530,7—523,3	6,57	6,58	6,24	6,02	6,47	6,72	—	—	—	—	6,43
525,5—518,2	7,32	7,30	—	—	—	—	—	—	—	—	7,31
520,0—513,6	7,68	7,00	6,94	7,20	7,35	7,38	—	—	—	—	7,26
515,6—508,9	8,30	—	8,30	—	—	—	—	—	—	—	8,30
511,1—504,6	8,72	8,34	8,00	8,40	8,50	—	8,40	—	—	—	8,41
506,4—500,4	9,35	—	—	—	—	—	—	—	9,30	9,10	9,25
501,3—496,2	9,86	—	9,90	—	—	—	—	—	9,60	9,58	9,74
498,1—492,2	10,49	—	10,40	—	10,60	—	—	10,50	10,50	10,08	10,43
494,0—488,3	—	—	—	—	—	—	—	10,69	10,90	—	10,80
490,1—484,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
486,3—481,1	—	—	—	—	—	—	—	11,89	12,22	—	12,06
479,1—474,2	—	—	—	—	—	—	12,08	13,41	13,54	—	13,01
472,3—467,6	—	—	—	—	—	—	13,53	14,35	14,84	—	14,24

Digitized by Google

Um den Verlauf der Lichtabsorption anschaulicher zu machen, habe ich die spezifischen Extinktionskoeffizienten als Ordinaten in ein Koordinatensystem eingetragen, die Wellenlängen (die jeweils die Mitte des betreffenden Spektralbereiches angeben) als Abszissen (Abb. 1.)

Aus der Abbildung ist sofort zu entnehmen, daß:

1. der oben erwähnte Schatten durch einen breiten Absorptionsbereich verursacht wird, der von Rot bis über Grüngelb hinüberreicht;

2. daß die Absorption weiterhin deutlich abnimmt, um dann blauwärts sehr bedeutend zuzunehmen. Diese letztere Zunahme konnte bloß eine Strecke weit verfolgt werden;

3. daß durch die Lichtabsorption unseres Körpers die einer Oxyhämoglobinlösung weit übertroffen wird (letztere siehe im unteren Teil der Abbildung).

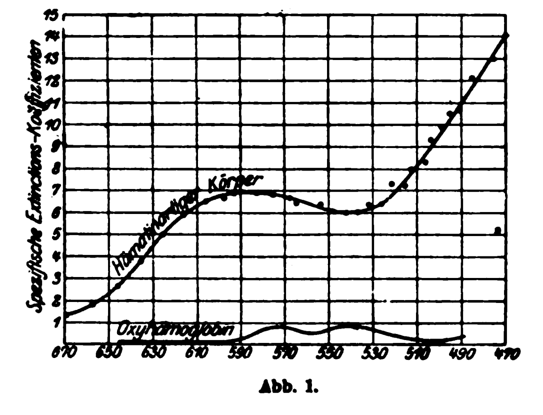


Abb. 1.

Sucht man aus Tab. I die Stelle der maximalen Absorption in Rot bis Gelbgrün festzustellen, so ergeben sich daraus große Schwierigkeiten, daß der Absorptionsstreifen sehr breit ist und die Kurve an dieser Stelle eine sehr flache, kaum mehr gerundete Kuppe trägt. Das Maximum habe ich gefunden an den am eingehendsten untersuchten Präparaten V—X:

Nr. V	zwischen	595,9—577,5	d. i. bei	586,7 $\mu\mu$
„ VI	„	595,9—570,5	d. i. bei	583,2 $\mu\mu$
„ VII	„	595,9—570,5	d. i. bei	583,2 $\mu\mu$
„ VIII	„	588,3—563,5	d. i. bei	575,9 $\mu\mu$
„ IX	„	604,4—570,5	d. i. bei	587,4 $\mu\mu$
„ X	„	595,9—577,5	d. i. bei	586,7 $\mu\mu$
			im Mittelwert	585,4 $\mu\mu$

Bei dieser Berechnung habe ich Präparat Nr. VIII außer Rechnung gelassen, da der betreffende Wert ganz aus der Reihe springt. Um die Stelle der größten Absorption womöglich noch genauer zu ermitteln, habe ich an Präparaten IX und X die al-

Digitized by Google

kalischen Lösungen, nachdem sie bereits eine Zeitlang gestanden hatten in noch weit kleineren Intervallen als sonst untersucht. Wie aus Tabelle II ersichtlich, ist mir eine engere Begrenzung des Maximums dadurch nicht gelungen.

Tabelle II.

Spezifische Extinktionskoeffizienten.

Spektralausschnitt $\mu\mu$	IX	X
604,4—592,4	6,76	6,89
600,2—588,7	6,78	6,95
598,5—586,9	6,79	6,91
596,8—585,4	6,83	6,93
595,9—584,7	6,87	6,99
595,1—583,9	6,86	6,97
593,5—882,4	6,85	6,98
592,0—580,8	6,68	6,98
590,5—579,6	6,87	7,02
589,0—578,2	6,87	7,00
588,3—577,5	6,84	7,00
587,4—576,8	6,86	6,95
585,7—575,4	6,79	6,93
585,7—574,0	6,79	6,91
580,4—570,5	6,76	6,86
577,0—567,0	6,68	6,93
573,5—563,5	6,60	6,68

Annähernd genau an den beiden von Hüfner zur Untersuchung des Blutfarbstoffes und seiner Derivate vorgeschlagenen Spektralstellen (genau an den Stellen, an denen auch Hári diese Bestimmungen ausgeführt hatte), d. i. bei 541,4—533,7 $\mu\mu$ und 565,6—556,1 $\mu\mu$, habe ich auch das Absorptionsverhältnis berechnet. In nachfolgender Zusammenstellung sind die betreffenden Versuche nach aufsteigender Konzentration der untersuchten Lösungen geordnet. Die erhaltenen Werte betrugen:

Nr.	Konzentration %	Bei 541,9 — 533,7 (a) $\mu\mu$	Bei 565,6 — 556,1 (b) $\mu\mu$	$\frac{b}{a}$
IX	0,0000902	0,0001664	0,0001521	0,914
Ib	102	1625	1548	0,953
Ia	117	1711	1603	0,937
IIa	1324	1669	1583	0,948
X	1329	1643	1503	0,915
IIb	147	1636	1511	0,924
V	1518	1639	1529	0,932
VIII	1548	1724	1580	0,916
VI	1612	1648	1519	0,921
VII	1612	1749	1594	0,912
XI	1711	1663	1465	0,901
Mittelwerte:		0,0001663	0,0001541	

Digitized by Google

Nach Hüfner ist es zur Beurteilung der Reinheit einer Lösung des Blutfarbstoffes oder seiner Derivate sehr wichtig; den Quotienten der Absorptionsverhältnisse an den beiden genannten Spektralstellen, und zwar den Wert $A_{565,6-556,1} : A_{541,4-533,7}$ festzustellen. Hierfür stehen mir, außer den Quotienten aus den oben angeführten Absorptionsverhältnissen noch zwei zur Verfügung. Es war nämlich an den Präparaten III und IV die Konzentration nicht bekannt, daher konnten die Absorptionsverhältnisse nicht bestimmt werden, der Wert der Quotienten ist aber ermittelbar aus den Extinktionskoeffizienten, wobei natürlich der gesuchte Quotient gleich ist: $E_{541,4-533,7} : E_{565,6-556,1}$

	bei 541,4—533,7	bei 565,6—556,5	daher der Quotient
Rinderblut III:	0,594	0,628	0,946
Rinderblut IV:	0,826	0,880	0,939

Rechnet man diese beiden Quotienten zu den obigen, aus den Absorptionsverhältnissen berechneten, hinzu und ermittelt so den Mittelwert, so ergibt sich ein Wert von **0,928**.

Ich habe auch Versuche darüber angestellt, ob aus dem spektrophotometrischen Verhalten der alkalischen Lösungen während des Aufbewahrens auf irgendeine Veränderung des Farbstoffs zu folgern sei. Wie aus Tabelle III hervorgeht. findet eine solche Veränderung nicht statt. (Das abweichende Verhalten der Lösung IIb kann ich nicht begründen.)

Tabelle III.

a) = bei 541,4—533,7 $\mu\mu$, b) = bei 565,6—556,1 $\mu\mu$.

Untersuchte Lösung	In den Spektralbezirken	Spezifische Extinktionskoeffizienten festgestellt.					
		Sofort	Innerhalb 24 Std.	Innerhalb 8 × 24 Std.	Innerhalb 5 × 24 Std.	Innerhalb 9 × 24 Std.	Nach 2 Monaten
IIb	a)	6,11	5,98	—	6,02	—	6,18
	b)	6,62	6,33	—	6,26	—	6,24
IIa	a)	5,99	5,83	5,90	—	—	—
	b)	6,30	6,20	6,26	—	—	—
VI	a)	6,10	6,30	—	—	—	—
	b)	6,60	6,80	—	—	—	—
IX	a)	6,00	—	6,25	6,19	—	—
	b)	6,55	—	6,55	6,57	—	—
XV	a)	6,18	6,18	6,16	6,10	6,19	—
	b)	6,64	6,64	6,60	6,60	6,67	—

Chemische Eigenschaften.

Eisengehalt: Bei den relativ sehr geringen Mengen, die mir von den Krystallen zur Verfügung standen, mußte ich von

Digitized by Google

einer Bestimmung von C, H und N vorläufig absehen und mich auf die zur Identifizierung des Körpers besonders wichtigen Eisenbestimmung beschränken. Diese wurde mittels des Autenrieth-Königsbergerschen[1]) Colorimeters vorgenommen. Als Testflüssigkeit habe ich eine ätherische Lösung von Rhodaneisen verwendet, diese in den Keil eingegossen und denselben mittels entsprechend verdünnter, genauest bereiteter Lösung von Ammoniumeisenalaun, die mit Rhodankalium versetzt und mit Äther extrahiert wurde, kalibriert.

Trotz aller darauf verwendeter Sorgfalt, gelang es mir nicht, auf diese Weise länger als 3 Wochen haltbare Testflüssigkeiten zu erhalten; nach dieser Zeit zeigten die anfangs rein bläulichroten Lösungen einen Stich ins Gelbe und erwiesen sich als unbrauchbar. Nach einer Reihe aus diesem Grunde mißlungener Bestimmungen bin ich dann so vorgegangen, daß ich die Eisenbestimmung an den zu verschiedenen Zeitpunkten erhaltenen Präparaten gruppenweise, mit einer frisch bereiteten und genau kontrollierten Testflüssigkeit vornahm. Zu den Bestimmungen wurden jeweils 0,05—0,08 g der im Vakuumtrockenschrank bei 60—70° getrockneten Krystalle in einen kleinen Platintiegel verascht, nach dem Vorgang von W. Autenrieth und Funk[2]) mit saurem, schwefelsauren Kalium aufgeschlossen, die Schmelze in eisenfreier verdünnter Salzsäure gelöst, auf ein bestimmtes Volumen aufgegossen und von dieser Lösung 1—2 ccm aus einer calibrierten Pipette zur Eisenbestimmung verwendet. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen waren die folgenden:

Präparat Nr.	Eisengehalt %	
V	8,00	Bestimmungen erfolgten am 15.—18. X. 1919. Der Vergleichskeil wurde angefertigt am 13. X.; kontrolliert am 20. X. 1919.
VI	7,64	
VII	7,41	
VIII	7,54	
IX	7,60	
X	7,52	Bestimmungen erfolgten am 20. XI. 1919. Der Vergleichskeil wurde angefertigt am 19. XI. 1919.
XI	7,52	
XII	7,70	
XIII	7,70	
XIV	7,88	
Mittelwert	7,65	

[1]) Autenrieth-Königsberger, Zeitschr. f. anal. Chem. 1913, S. 137.
[2]) Autenrieth und Funk, Münch. med. Wochenschr. 59, S. 765 u. 766.

Digitized by Google

Umwandlung in Hämin. Eine minimale Menge der Krystalle wurde unter dem Deckglas mit einer Spur Kochsalz und konz. Essigsäure kurze Zeit erhitzt; worauf nach dem Erkalten an Stelle der schmalen, kurzen Nadeln meines Körpers, die braunen, weit breiteren, typischen Teichmannschen Krystalle getreten waren.

Reduktion zu Hämochromogen. Wird die ammoniakaliche Lösung unter Luftabschluß mit wenig festen Natriumhyposulfit versetzt, so geht die olivengrüne Farbe, sofort nach dem Umschütteln in eine bläulich-rote über; das Spektrum der Lösung zeigt zwei äußerst charakteristische Streifen in Gelbgrün resp. Grün. Es sind dies die bekannten Absorptionsstreifen des Hämochromogens. Es wird also die von mir krystallisiert erhaltene Verbindung in ammoniakalicher Lösung bei Ausschluß von Sauerstoff zu Hämochromogen reduziert.

Die Lösung ist sehr wenig haltbar; bei Zutritt von Luft erfolgt sehr bald die Rückverwandlung in die frühere olivengrüne Flüssigkeit. Läßt man sie ohne Luftzutritt stehen, so entsteht, falls vorher die zur vollständigen Reduktion notwendige Menge von Hyposulfit hinzugefügt worden war, nach 10—20 Min. langem Stehen eine Trübung, nach 5—6 Stunden ein schön braunroter Niederschlag, wie dies bezüglich einer alkoholischen Hämatinlösung bereits von Cazeneuve[1]) beschrieben wurde.

Beim Versuche, diesen Niederschlag durch Zentrifugieren zu isolieren und von der Mutterlauge rein zu waschen, ändert sich seine Farbe zusehends; sie geht, offenbar durch Reoxydation, wieder in das ursprüngliche Schwarz über.

Beim Versuche, die Lösung der Krystalle in Kali- oder Natronlauge in ähnlicher Weise mittels Natriumhyposulfits zu reduzieren, sieht man die olivengrüne Flüssigkeit ebenfalls intensiv rot sich färben; doch erscheinen im Spektrum diesmal nicht wie oben die zwei charakteristischen Streifen des Hämochromogens; man sieht bloß einen wenig intensiven Absorptionsstreifen an der Grenze von Rot und Gelb. Wurde aber die Lösung in Lauge auch mit Ammoniak versetzt und so reduziert, so erscheinen, wie in der rein ammoniakalischen Lösung, die beiden

---

[1]) P. Cazeneuve, Compt. rend. 84, S. 452.

Digitized by Google

dunklen Streifen des Hämochromogens. Dasselbe wurde bereits von Bertin-Sans und Moitessier[1]) vom Hämatin beschrieben.

Chemische Natur der Krystalle. Vieles spricht dafür, daß wir es mit einer Art Hämatin zu tun haben. So z. B.:

1. Die Bildungsweise, da ja der Säure eine wesentliche Rolle zukommt.

2. Der hohe Eisengehalt, indem es durch Abspaltung des eisenfreien Teiles des Hämoglobinmoleküls in dem restierenden Anteil zu einer Anreicherung an Eisen kommt.

3. Die Leichtigkeit, mit der sich typische Häminkrystalle erhalten lassen.

4. Der Umstand, daß man durch Reduktion der ammoniakalischen Lösung Hämochromogen enthält.

Doch widersprechen dieser Annahme auch eine Anzahl von Momente, wie z. B.:

1. Hämatin ist in konzentrierter Essigsäure, Phenol, rauchender Salzsäure und in verdünnten Lösungen von kohlensaurem-Natrium löslich.

2. Der Eisengehalt wird zu 8,9% gefunden, also weit höher, als ich oben gefunden habe.

3. Das Maximum der Lichtabsorption einer Lösung von Hämatin wurde von verschiedenen Autoren an verschiedensten Stellen angegeben, die durchaus nicht mit dem übereinstimmen, was ich oben ausführlich erörtert habe. So hat E. Ziemke und Fr. Müller[2]) Maxima bei 611—582 $\mu\mu$; Lewin, Miethe und Stenger[3]) bei 616, 558, 554 $\mu\mu$; gefunden.

Dementsprechend ist auch der Quotient der Absorptionsverhältnisse, der für das Hämatin an den von mir untersuchten beiden Spektralstellen von Bürker[4]) gefunden wurde, anders, nämlich 1,09, also größer als der von mir gefundene.

Doch stimmen die von mir dargestellten Krystalle in ihren Eigenschaften auch mit denen von Piettre und Vila[5]), denen

---

[1]) H. Bertin-Sans et J. Moitessier, Compt. rend. 116, S. 401—403.

[2]) Arch. f. Anat. u. Physiol. 1901. Suppl. 177.

[3]) Arch. f. d. ges. Physiol. 118, 80. 1907.

[4]) Bürker, Tiegerstedts Handbuch der physiologischen Methodik 2, Abth. 1.

[5]) Compt. rend. de l'Acad. des Sc. 141. 1906.

Digitized by Google

sie vermöge ihres Entstehungsart am nächsten stehen, nicht überein. So wird der Eisengehalt der Krystalle von Piettre und Vila mit 9,3% angegeben. Desgleichen besteht ein bedeutender Unterschied gegenüber der Lichtabsorption der Piettre und Vilaschen Kristalle, indem dieser Autor Maxima bei 606, 534 und 494 $\mu\mu$ gefunden hat. —

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Prof. Paul Hári ausgeführt.

Digitized by Google

Die Zerstörung von Lab und Pepsin durch Alkali.

Von

L. Michaelis und M. Rothstein.

(Aus dem biologischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban in Berlin.)

(Eingegangen am 2. Februar 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Es ist heute allgemein bekannt, daß die Wirksamkeit aller Fermente von der h[1]) abhängig ist. Hierüber liegen jetzt schon sehr zahreiche quantitative Untersuchungen vor. Die Fermente reagieren aber auf die h noch in einer anderen Weise. Sie werden nämlich in Lösungen von etwas höherer Alkalität oder Acidität in irreversibler Weise zerstört. In manchen Fällen liegt die h des Wirkungsoptimums von derjenigen h, bei der die Fermente schnell irreversibel zerstört zu werden beginnen, ziemlich weit entfernt, in anderen Fällen liegen beide näher beieinander. So z. B. liegt das Wirkungsoptimum der Invertase bei $p_H = 4,5$; die Invertase selbst ist aber bis zu $p_H =$ ca. 7 bis 8 lange Zeit sehr gut haltbar, d. h. eine Invertaselösung, deren Wirksamkeit bei $p_H = 4,5$ gemessen wurde und dann auf $p_H = 7$ gebracht wird, wo sie viel weniger wirksam ist, zeigt, wenn sie nunmehr wieder auf $p_H = 4,5$ gebracht wird, die ursprüngliche volle Wirksamkeit. Wird sie aber auf $p_H = 9$ bis 10 gebracht, so wird sie schnell irreversibel zerstört. Bei Überschreitung der sauren Reaktion liegt die Schwelle der zerstörenden h der optimal wirkenden h viel näher. So zeigten Michaelis und Davidsohn[2]), daß schon bei $p_H = 3$ bei 25° eine ziemlich schnelle Zerstörung der Invertase eintritt. Genaue Untersuchungen über die Zerstörung der

---

[1]) h bedeutet Konzentration der H-Ionen; oh Konzentration der OH'-Ionen.

[2]) Diese Zeitschr. 39, 386. 1911.

Digitized by Google

Invertase bei verschiedenem p_H haben Euler und Laurin[1]) angestellt. Sie zeigten, daß das von Sörensen sowie von Michaelis und Davidsohn bestimmte Wirkungsoptimum auch gleichzeitig das Optimum der Haltbarkeit darstellt. E. und L. beobachteten auch, daß der Gang der Zerstörung nicht streng der einer monomolekularen Reaktion ist. Das Trypsin ist noch in ziemlich weiter Entfernung von seinem Reaktionsoptimum ganz gut haltbar. Quantitative Untersuchungen darüber sind noch nicht angestellt. Besonders labil ist nach Untersuchungen von Michaelis und Rona[2]) die Maltase. Sie ist nur in ganz engem Bereich um ihr Wirkungsoptimum haltbar und wird dicht oberhalb und unterhalb desselben schnell zerstört. Ein näheres Studium dieser Verhältnisse schien uns von Wichtigkeit, weil uns hierdurch ein gewisser Einblick in die Natur der Fermente gewährt wird.

Wenn wir uns eine Vorstellung machen wollen, auf welche Weise diese Zerstörung zustande kommt, so wird uns durch analoge Verhältnisse bei einfacheren chemischen Körpern der Weg gewiesen. Ein lehrreiches Beispiel ist folgendes: Glucose wird durch alkalische Reaktion verändert, zunächst unter Bildung von anderen stereoisomeren Zuckern, wie Lobry de Bruyn[3]) nachwies. Michaelis und Rona[4]) zeigten nun, daß die Anfangsgeschwindigkeit, mit der Glucose bei gegebener Konzentration verschwindet, genau proportional der Konzentration der OH′ ist. Nun ist aber Glucose bekanntlich eine schwache Säure, deren Dissoziationskonstante Michaelis und Rona zu $6{,}6 \cdot 10^{-13}$ bestimmten. Die Konzentration der Glucoseionen muß nun, solange sie der Gesamtmenge der Glucose gegenüber sehr klein ist, der h umgekehrt, also der oh direkt proportional sein. Wenn wir nun annehmen, daß die Glucoseionen sich spontan umwandeln, so ist damit die Wirkung der oh erklärt. Für die Glucoseionen ließ sich nun auch in der Tat eine Ursache ihrer spontanen Labilität finden. Man muß nämlich annehmen, daß die Ionen der

---

[1]) H. v. Euler und J. Laurin, Zeitschr. f physiol. Chem. 108, 64. 1919.

[2]) L. Michaelis und P. Rona, Diese Zeitschr. 57, 70. 1913.

[3]) Lobry de Bruyn, Recueil de travaux chim. des Pays-Bas 14, 156 u. 203; 16, 262.

[4]) L. Michaelis und P. Rona, Diese Zeitschr. 47, 447. 1912.

Digitized by Google

Glucose weder die Aldehydkonstitution noch die Tollenssche Konstitution haben, sondern die Wohl-Neubergsche Enolkonstitution; denn ein Enol hat von diesen drei Konfigurationen zweifellos am meisten einen sauren Charakter. Nun ist aber das Enol der Glucose, Mannose und Fructose identisch. Da nun das chemische Gleichgewicht zwischen Glucose und ihren Ionen ein dynamisches ist und sich fortwährend Glucose zu Glucoseionen bildet und Glucoseionen zu Glucose zurückbilden, so ist kein Grund einzusehen, warum bei dieser Rückbildung immer nur Glucose entstehen sollte. Es entstehen vielmehr alle diejenigen Zuckerarten, die eine gemeinschaftliche Enolform haben. So bildet sich also die Glucose auf ihrem Wege über enolartig konstituierte Ionen allmählich bis zur Erreichung einer Gleichgewichtslage in andere Zucker um.

So durchsichtig liegen nun die Verhältnisse bei den Fermenten nicht. Wir sind aber wohl berechtigt, uns den Vorgang analog vorzustellen. Z. B. würde der Zerfall der Invertase durch einen Überschuß von Säure auf folgende Weise erklärbar sein. Invertase ist ein Ampholyt. Im Reaktionsoptimum ist sie als undissoziierter Ampholyt vorhanden. Durch Säureüberschuß wird sie zum Kation. Dieses Kation verwandelt sich spontan irreversibel in einen nicht mehr fermentartig wirkenden Körper um, weil mit der Ionenbildung gleichzeitig erst eine Umlagerung eintritt. Worin diese Umlagerung besteht, ist vorläufig nicht zu entscheiden. Man könnte an tautomere Umlagerungen denken, wie sie bei organischen Farbstoffen so häufig vorkommen, wo z. B. das Phenolphthalein eine lactoide, sein Ion aber eine chinoide Form hat. Es muß aber bei der Zerstörung der Invertase weiter hinzukommen, daß eine dieser beiden Formen spontan irreversibel zerfällt. Diese irreversible Veränderung könnte z. B. eine hydrolytische Spaltung oder eine Ausflockung sein. Das letztere scheint für die Fermente eine recht annehmbare Deutung zu sein.

Um einen Einblick in diese Verhältnisse zu bekommen, ist es zunächst notwendig, experimentelles, quantitativ verwertbares Tatsachenmaterial zu schaffen. Es erschien uns deshalb lohnend, die Zerstörung eines Ferments durch Alkali quantitativ zu verfolgen.

Quantitative Untersuchungen über die Zerstörung von Fermenten, Toxinen u. dgl. liegen bisher mehrere vor, bei denen

Digitized by Google

das zerstörende Agens Wärme, Licht, Röntgenstrahlen, radio aktive Strahlen usw. war. Die Zerstörung durch H˙ und OH′ wurde quantitativ bisher nur von Euler und Laurin (l. c) an der Invertase verfolgt. Unter den zahlreichen Versuchen von Madsen und Walbum[1]) über die Zerstörung des Labs finden sich auch einige über die Zerstörung desselben durch NaOH vor; sie sind aber nur zum Teil für uns verwertbar, da die Angaben über die Alkalität der Lösungen noch nicht durch Messung der *oh* bestimmt sind. Ihre Folgerung, daß die Geschwindigkeit der Zerstörung des Labs der dritten Wurzel aus der jeweiligen Konzentration der Labmenge bei gegebener Alkalität proportional sei, ist daher heute nicht mehr ohne weiteres verwertbar, da diese gegebene Alkalität nicht durch *oh*, sondern durch die hinzugefügten Kubikzentimeter Lauge ausgedrückt wird. Die endgültige *oh* ist aber in einer Fermentlösung, welche doch als Puffer zu betrachten ist, der zugegebenen Laugenmenge nicht einfach proportional. Dagegen ist es interessant, daß Madsen und Walbum den Reaktionsverlauf bei ihrem Labpräparat (Kälberlab) monomolekular fanden, was für unser Präparat (Pepsin aus Schweinemagen), wie wir sehen werden, nicht zutrifft. Wir haben nunmehr unter Anwendung der elektrometrischen Messung die Zerstörung von Lab und Pepsin durch die *oh* zum Gegenstand unserer Untersuchungen gemacht.

I. Methode der Labbestimmung.

Die Bestimmung von Lab und Pepsin geschah nach einer Methode, welche der eine von uns im Prinzip schon[2]) veröffentlicht hat. Da es sich aber an jener Stelle nur um die Bedürfnisse der Klinik handelte und wir jetzt viel höhere Ansprüche an Genauigkeit zu stellen haben, soll die Methode mit Rücksicht hierauf noch einmal genau beschrieben werden. Sowohl die Methode für Pepsin wie für Lab beruht darauf, daß man durch Reihenversuche diejenige Verdünnung der zu untersuchenden Fermentlösung feststellt, welche in gleichen Zeiten die gleiche Wirkung zeigt wie eine bestimmte, stets reproduzierbare Einheitsfermentlösung.

---

[1]) Recherches sur l'affaiblissement de la présure. Festschrift für Hammarsten X, Upsala 1906; ferner Arrhenius, Immunochemie S. 57.

[2]) L. Michaelis, Dtsch. med. Wochenschr. 1918, Nr. 25.

Digitized by Google

1. Das Kontrollferment.

Die Kontrollfermentlösung wurde auf folgende Weise hergestellt. Irgendein gutes, von früher her aufbewahrtes, festes Pepsinpräparat, welches nicht wie das übliche Pepsinpräparat der Apotheke mit Zucker vermischt ist, wurde mit der zehnfachen Menge 10proz. Kochsalzlösung etwa eine Woche im Zimmer stehengelassen, filtriert und mit der gleichen Menge Glycerin versetzt, im Eisschrank aufbewahrt. Eine solche Lösung ist, wie schon Morgenroth[1]) beschrieben hat. so gut wie unbegrenzt haltbar. Dieser fand nach $1^1/_2$ Jahren noch keine Abnahme des Fermentgehaltes. Wir können über die Haltbarkeit auf sehr lange Zeiträume noch keine bestimmten Angaben machen, können jedoch aussagen, daß es sich während der Zeit, über die sich unsere Versuche erstrecken, nicht geändert hat. Den strengen Beweis dafür könnte man nur dadurch erbringen, daß der Fermentgehalt, geprüft an einer gut reproduzierbaren Durchschnittsmilch, sich über Monate und Jahre nicht ändert. In dieser strengen Weise können wir den Beweis allerdings nicht erbringen, denn es ist uns in jetziger Zeit nicht möglich gewesen, an verschiedenen Tagen Milch zu erhalten, welche selbst bei einem stets gleich bemessenen Überschuß von $CaCl_2$ immer die gleiche Gerinnbarkeit gezeigt hätte. Aber die Gerinnungszeit verschiedener Milchproben, unter dem Einfluß einer ganz bestimmten Verdünnung dieser Fermentstammlösung, schwankte doch über viele Monate um einen Mittelwert, ohne einen Gang zu zeigen. Wir können daraus schließen, daß in etwa 4 Monaten jedenfalls keine merkliche Abnahme des Fermentgehalts eingetreten sein kann. Da wir überdies diejenigen Versuche, bei denen es wünschenswert erscheinen konnte, die an verschiedenen Tagen erhaltenen Fermentbestimmungen untereinander zu vergleichen, auf einen Monat zusammendrängen konnten, so können wir für diese Zeit mit Bestimmtheit aussagen, daß keine Änderung der Standardfermentlösung eingetreten ist, welche groß genug wäre, um einen Einfluß auf unsere Resultate auszuüben.

Von dieser Standardfermentlösung wurde nun jeden Tag eine frische Verdünnung angesetzt. Die Abmessung der Glycerinlösung erforderte besondere Sorgfalt. Es wurde mit einer Pipette

[1]) J. Morgenroth, Centralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenk. 26, 354. 1899.

Digitized by Google

von stets gleicher Form — 1 ccm, in $^1/_{100}$ geteilt, auf Ausblasen geeicht — die Glycerinlösung zunächst so genau wie möglich bis zu einer bestimmten Höhe, nämlich 0,3 ccm, aufgesaugt, genau bis zum Inhalt von 0,25 ccm wieder abgetropft und die außen anhaftende Glycerinlösung abgetupft. Der übrigbleibende Inhalt von 0,25 ccm wurde nun in einen Kolben mit 25 ccm destilliertem Wasser entleert und durch wiederholtes Aufsaugen und Ausblasen vollständig ausgewaschen. Obwohl die Volumabmessung bei diesem Verfahren nicht mehr genau dem auf Ausblasen geeichten Inhalte der Pipette entspricht, so wurde sie doch jedenfalls stets in genau der gleichen Weise vorgenommen. Die viscöse Beschaffenheit der Glycerinlösung macht diese Form der Abmessung erforderlich.

Diese hundertfache Verdünnung der Standardlösung, genannt die Pepsinkontrolle, stellt die für die später zu beschreibende Pepsinmessung angewandte Vergleichslösung dar. Eine hundertfache Verdünnung dieser Pepsinkontrolle mit destilliertem Wasser stellt die Vergleichslösung für die Labbestimmung dar.

Über die Reproduzierbarkeit dieser Vergleichslösung geben folgende Versuche Auskunft. Mehrere unmittelbar nacheinander aus der Glycerinlösung hergestellte Verdünnungen zeigten bei einer Gesamtgerinnungszeit von etwa 5—8 Minuten Unterschiede der Gerinnungszeiten bis zu höchstens 15 Sekunden. Die Haltbarkeit der Verdünnung ist so groß, daß eine 5 Stunden alte, bei Zimmertemperatur aufbewahrte und eine frisch hergestellte Kontrollösung keine größeren Abweichungen in der Gerinnungszeit zeigten als die eben genannten; dagegen zeigten sich solche nach eintägigem Aufbewahren der Verdünnung.

Die immerhin verhältnismäßig gute Haltbarkeit des Ferments in destilliertem Wasser beruht auf dem stets vorhandenen CO_2-Gehalt desselben. Wir werden nämlich zeigen, daß es bei der *h* des theoretisch reinen Wassers durchaus nicht mehr auf lange Zeit haltbar ist. Es wäre daher nicht angebracht, als Verdünnungsflüssigkeit ein besonders reines Wasser, etwa ausgekochtes oder Leitfähigkeitswasser, zu benutzen. In abgestandenem Leitungswasser ist die Haltbarkeit noch erheblich schlechter, wie sich aus seiner *h* leicht erklären läßt.

Die Abmessung der Glycerinlösung ist zwar immer zur Zufriedenheit gelungen; jedoch versuchten wir, ob man nicht statt der zähen Glycerinlösung eine mit HCl leicht angesäuerte Pepsin-

Digitized by Google

lösung als Standardlösung anwenden könnte. Wir stellten eine solche von einer $h = 3{,}16 \cdot 10^{-3}$ her. Diese wies nach 7wöchiger Aufbewahrung im Eisschrank noch keine sicher außerhalb der Fehlergrenzen reichende Abnahme des Fermentgehaltes auf. Vielleicht wäre auch eine solche Lösung als Standardkontrollferment brauchbar. Nach Monaten verschimmelt sie jedoch.

2. Die Vorbereitung der zu untersuchenden Fermentlösung.

Das Prinzip der Labbestimmung besteht darin, daß man diejenige Verdünnung der zu untersuchenden Fermentlösung aufsucht, welche ein gleiches Volumen Milch in derselben Zeit zur Gerinnung bringt wie die Kontroll-Lablösung. Da nun die Gerinnungszeit außerordentlich von der h abhängt, so entsteht die Frage, ob es nötig ist, die Fermentlösungen, welche ja die ganz verschiedensten Aciditäten haben können — von wässerigen Fermentlösungen bis zu den stark sauren Magensäften —, vorher zu neutralisieren. In der Tat verlangen einige Autoren für die Labbestimmung im Magensaft eine vorherige sorgfältige Neutralisierung. Wir können diese Frage mit Bestimmtheit dahin beantworten, daß die Neutralisierung nicht nur unnötig, sondern sogar fehlerhaft ist.

Unnötig ist sie aus folgendem Grunde: Die Milch ist vermöge ihres Gehalts an Phosphaten und Casein ein so guter Puffer, daß ihre h durch alle praktisch vorkommenden Fermentverdünnungen nicht meßbar geändert wird. Wenn die zu untersuchende Fermentlösung nicht gerade nur Spuren Lab enthält, so ist diejenige Verdünnung, welche gleichzeitig mit der Kontrolllösung die Gerinnung hervorruft, in der Regel so hoch, daß die in ihr enthaltenen Stoffe, die einen Einfluß auf die h haben könnten, von den Puffern der Milch „verschluckt" werden. Die folgende Tabelle zeigt, wie sich die p_H der Milch durch einen Zusatz von normalem Magensaft in verschiedenen Verdünnungen ändert.

Tabelle I.

Rohe Milch, mit normalem Magensaft im Verhältnis von $n : 1$ verdünnt, ergibt p_H:

n	∞	100	32	10	5
p_H	6,42	6,42	6,40	6,27	5,94

Digitized by Google

Wie sehen also, daß p_H der Milch sich selbst bei einem Zusatz eines 32 fach verdünnten Magensaftes nicht mehr meßbar ändert. Die Magensaftverdünnung, welche gleichzeitig mit der Kontrolle gerinnt, ist aber in der Regel eine 100- bis 300 fache Verdünnung. In noch höherem Maße trifft dies für unsere künstliche Lablösung zu.

Fehlerhaft aber ist die oben erwähnte Neutralisierung aus dem Grunde, weil man dabei in einer nicht überblickbaren und nicht reproduzierbaren Weise einen Teil des Labferments zerstört. Das kommt daher, daß das Ferment auch durch die geringfügigste alkalische Reaktion mit ungeheurer Geschwindigkeit irreversibel zerstört wird. Beim Eintropfen der Lauge in den Magensaft bilden sich nun lokal hohe Alkalitäten, bis die eingetropfte Lauge völlig verteilt ist. Daher ist auch die Zerstörung des Labs um so größer, je langsamer man die zugefügte Lauge verteilt. Bei schneller Verteilung kann man die Fermentschädigung wohl auch vermeiden, hat aber niemals die Sicherheit, sie vermieden zu haben.

Nun kommt aber hinzu, daß die h der Milch[1]) in der Regel dem Optimum der Labwirkung entspricht, welches Michaelis und Mendelssohn[2]) festgestellt haben.

Besonders gilt das für die h der mit $CaCl_2$ versetzten Milch, welche ein wenig größer ist als ohne $CaCl_2$.

	p_H
Rohe Milch	6,58
Gekochte Milch	6,51
Rohe Milch + $^1/_{10}$ Vol. 10proz. $CaCl_2$-Lösung	5,95
Gekochte Milch + $^1/_{10}$ Vol. 10proz. $CaCl_2$-Lösung	5,96

Das Optimum der Labwirkung ist nun kein scharfer Punkt, sondern eine ziemlich breite Zone. Zwischen $h = 4 \cdot 10^{-7}$ und $h = 1 \cdot 10^{-6}$ ist kein sicherer Unterschied zu bemerken. Um so mehr können wir also von einer Neutralisierung der zu prüfenden Lösung absehen.

Irgendeine Vorbehandlung der zu untersuchenden Fermentlösung ist also nicht angebracht, solange die Bedingung erfüllt ist, daß diejenige Verdünnung, welche gleichzeitig mit der Kontrolle gerinnt, die h der Milch nicht wesentlich ändert.

[1]) H. Davidsohn, Zeitschr. f. Kinderheilk. 9, 11. 1913.

[2]) L. Michaelis und A. Mendelssohn, diese Zeitschr. 58, 315. 1913.

Digitized by Google

3. Die Vorbereitung der Milch.

Bei höherem Kalkgehalt ist der Beginn der Gerinnung plötzlicher und leichter zu beobachten als bei niederem. Manche Milchproben sind ohne Kalkzusatz so schwer zur Gerinnung zu bringen, daß die Versuche sich unnötig in die Länge ziehen würden. Wir arbeiteten also immer mit einer Milch, der $CaCl_2$ zugefügt war. Gekochte Milch ist überhaupt nur nach Zusatz von $CaCl_2$ brauchbar, dann aber ist sie sogar noch vorteilhafter als rohe Milch, da die Gerinnung viel plötzlicher erfolgt. Bei roher Milch kann man leicht bezüglich des Gerinnungszeitpunktes um einige Sekunden im Zweifel sein, während man bei gekochter Milch den Zeitpunkt fast auf die Sekunde angeben kann. Wir verwendeten daher stets folgende Mischung: frisch gekochte und wieder abgekühlte Milch + $^1/_{10}$ Volumen einer $CaCl_2$-Lösung. Diese wurde durch Auflösen von 10 g möglichst trockener Krystalle von wasserhaltigem $CaCl_2$ auf 100 ccm Wasser hergestellt.

4. Die Ausführung der Labbestimmung.

In eine Reihe von 6 Reagensgläsern werden je 2 ccm destillierten Wassers gebracht, sodann in das erste Röhrchen 2 ccm der zu untersuchenden Fermentlösung; nach Vermischung werden diesem 2 ccm entnommen, in das zweite Röhrchen gebracht usf. Jedes folgende Röhrchen enthält also die halbe Fermentmenge des vorangehenden. Nunmehr werden in ein weiteres Röhrchen 2 ccm der Kontrollablösung und dann schnell hintereinander in jedes Röhrchen 2 ccm Milch. Die Mischung wird sofort umgeschüttelt und die Gerinnung bei Zimmertemperatur beobachtet. Die Gerinnung der Kontrolle wird in der Regel zwischen die zweier benachbarter Röhrchen der Reihe fallen. Hiermit ist der Vorversuch beendet. Je nach dem Fermentgehalt der zu untersuchenden Lösung wird man die Reihe mit der unverdünnten, 10 fach, 100 fach od. dgl. verdünnten Lösung anfangen.

Der Hauptversuch besteht nun in einer genaueren Austitrierung. Angenommen z. B., die Gerinnung der Kontrolle sei zwischen der 100- und 200 fachen Verdünnung, aber viel näher an der 100 fachen erfolgt, so würde man nun etwa eine 80 fache Verdünnung der zu untersuchenden Lösung herstellen. Von dieser fügt man in ine Reihe von 4 Reagensgläsern je 2,0; 1,6; 1,3; 1,0 ccm und füllt die Röhrchen mit destilliertem Wasser

Digitized by Google

alle auf 2,0 ccm auf. Ein 5. Röhrchen wird mit 2 ccm der Kontrollfermentlösung gefüllt. Nunmehr werden in jedes Röhrchen 2 ccm Milch eingefüllt, und zwar aus leicht verständlichen Gründen in der Reihenfolge: Röhrchen I, II, Kontrolle, III, IV. Die Einfüllung der Milch muß rasch hintereinander geschehen und nimmt in der Regel für alle Röhrchen nicht mehr als 20—25 Sekunden in Anspruch. Da die Kontrolle als mittelstes Röhrchen eingefüllt wurde, ist der zeitliche Unterschied jedes Röhrchens gegen die Kontrolle im höchsten Falle 12 Sekunden, was in Anbetracht der gesamten Gerinnungszeit — bei nicht zu warmer Zimmertemperatur 8—10 Minuten — zu vernachlässigen ist.

Die Reproduzierbarkeit der Versuche ist auch ohne Wasserbad gut. Das beruht darauf, daß etwaige Temperaturschwankungen von allen Röhrchen in gleicher Weise mitgemacht werden und daher belanglos sind. Fällt die Gerinnungszeit der Kontrolle mit der eines Röhrchens der Reihe zusammen, so ist der Fermentgehalt der zu untersuchenden Lösung gleich dem Verdünnungsgrad dieses Röhrchens; fällt sie hingegen nicht genau zusammen, so wird die der Kontrolle gleichwertige Verdünnung durch Interpolation oder durch eine weitere, noch feiner abgestufte Verdünnungsreihe ermittelt. Die Interpolation geschah unter Anwendung des Fuldschen Labzeitgesetzes, daß das Produkt aus Fermentkonzentration und Zeit konstant ist Obwohl zwar dieses für das Kälberlab geltende Gesetz für unser Präparat nicht streng zutrifft, so sind die Abweichungen von ihm doch nicht so groß, daß man es nicht zur Interpolation benutzen könnte.

Den Genauigkeitsgrad der Bestimmungen können wir nach unseren Erfahrungen bei Berücksichtigung aller Faktoren auf ± 5% der Gesamtfermentmenge einschätzen, ein für eine Fermentmethode wohl gut zu nennendes Resultat. Da es sich in unseren Versuchen darum handelte, das Labferment zu bestimmen in einer Lösung, welche zum Teil zerstörtes Labferment enthielt, mußte der Nachweis erbracht werden, daß die Gegenwart des zerstörten Ferments keinen Einfluß auf die Bestimmung des noch aktiven Ferments hat. Zu diesem Zweck wurde eine 4proz. Lablösung durch eine Überschuß von NaOH zerstört, mit HCl neutralisiert und nochmals mit der gleichen Labmenge versetzt. Andererseits wurde destilliertes Wasser statt der zerstörten Lablösung als Verdünnungsflüssigkeit für die aktive Lablösung be-

Digitized by Google

nutzt. Die Bestimmung ergab in beiden Fällen den gleichen Fermentgehalt. Das zerstörte Labferment hat also keinen Einfluß auf die Bestimmung des aktiven Ferments.

H. Kinetik der Labzerstörung.

1. Charakterisierung des angewendeten Fermentpräparates.

Als Fermentpräparat wurde Pepsin Grübler angewendet. Das Präparat hat äußerlich etwa die Beschaffenheit von getrocknetem Eiweiß und verquillt in Wasser zu einer je nach dem Verdünnungsgrad mehr oder weniger viscösen Lösung. Die wässerige Lösung des Präparats reagiert etwas sauer, offenbar infolge eines geringfügigen Gehalts an HCl, welche zumeist an Peptone gebunden vorhanden ist. P_H einer 4 proz. Lösung = 3,51. Infolgedessen zeigen Pepsinlösungen, mit einem Puffer versetzt, immer eine etwas höhere h, als dem Puffer entspricht.

2. Gang der Labzerstörung bei einer gegebenen h.

Zunächst werden einige Versuche beschrieben, bei denen die h durch einen Phosphatpuffer konstant gehalten wurde, um einen Einblick in die allgemeine Kinetik der Zerstörung zu bekommen. Grobe Vorversuche zeigten, daß bei ausgesprochen saurer Reaktion, also z. B. bei $p_H < 6$, auch nach Stunden keine wesentliche Abnahme des Ferments eintrat. Dementsprechend wurde die Fermentlösung zunächst mit einer bestimmten Menge $^m/_{15}$ prim. Phosphatlösung versetzt, im Wasserbad auf die Versuchstemperatur vorgewärmt und zu einer gegebenen Zeit mit einer bestimmten Menge ebenfalls vorgewärmter $^m/_{15}$ sek. Phosphatlösung vermischt. Dann wurden in angemessenen Abständen je 10 ccm der Mischung für die weitere Untersuchung entnommen. Die erste Entnahme geschah sofort nach der Vermischung; ihr Zeitpunkt wurde als Null bezeichnet. Die weitere Verarbeitung der Entnahme geschah in folgender Weise. In einer Reihe von Kölbchen befanden sich bei Zimmertemperatur je 5 ccm einer Lösung von $^m/_{15}$ prim. Phosphat. Die entnommenen 10 ccm Fermentmischung wurden nun sofort in eins solcher Kölbchen gebracht. Dadurch wurde die Lösung je nach der Zusammensetzung der Fermentmischung auf eine mehr oder weniger saure Reaktion gebracht; auf jeden Fall überzeugten wir uns durch Vorversuche, daß h nicht $< 10^{-6}$ war, meist war sie noch viel

Digitized by Google

größer. Auf diese Weise wurde die Fermentzerstörung unterbrochen. Dann wurden in den einzelnen Proben Bestimmungen des Labgehalts vorgenommen. Die Angaben sind alle umgerechnet auf diejenige Konzentration, welche die Fermentlösung vor Zusatz der Phosphate gehabt hatte.

Betrachten wir nun den Gang der Labzerstörung an einigen herausgegriffenen Beispielen, so finden wir folgendes.

Tabelle II.

Nummer	Temp. C°	p_H	p_{OH}	t Min.	k_1	k_2	1,5 $k_{1,5}$	Mittleres 1,5 $k_{1,5}$	$a-x$ gefund. Lab E	$a-x$ berech. n. mittl. $k_{1,5}$ Lab E
1	25,45	6,90		0					3940	
		korr.		30	0,0738	0,0000180	0,000695		750	750
		6,87	7,01	61	0,0306	0,0000271	0,000716	0,000696	281	299
				97	0,0144	0,0000330	0,000678		150	147
2	25,5	6,93		0					3330	
		korr.		5,5	0,0453	0,0000212	0,00107		1875	1835
		6,90	6,98	13,5	0,0362	0,0000231	0,00097	0,001075	1080	984
				29,2	0,0318	0,0000283	0,00110		393	422
				47,0	0,0263	0,0000509	0,00116		194	216
3	25,6	7,01		0					194,5	
		korr.		9	0,0137	0,0000944	0,00122		146,5	146,9
		6,98	6,90	21	0,0117	0,0000939	0,00112		110,3	107,9
				39	0,0114	0,0001280	0,00125	0,00120	68,8	71,2
				60	0,0099	0,0001405	0,00119		48,9	48,5
				120	0,0081	0,0001770	0,00122		21,0	21,5
4	36,8	6,57		0					220	
		korr.		17	0,0104	0,0000670	0,000888		146,5	145,4
		6,494	7,011	30,5	0,0098	0,0000740	0,000909	0,000909	110,3	110,3
				46,0	0,0093	0,0000805	0,000909		83,7	83,7
				62,0	0,0090	0,0000949	0,000972		61,3	65,2

Unter p_H ist zunächst der bei 16°—18° gemessene, dann der für die Versuchstemperatur korrigierte Wert angegeben.

Wir finden also, daß die Zerstörungsgeschwindigkeit, wie ja auch zu erwarten war, nicht konstant ist, sondern sich mit der Zeit ändert, und zwar abnimmt. Es wurde nun versucht, die Reaktionsordnung festzustellen. Die einfachste Annahme wäre die der gewöhnlichen monomolekularen Reaktion, welche zur Voraussetzung hat, daß die Geschwindigkeit der Zerstörung in jedem Augenblick proportional der noch vorhandenen Menge des Ferments ist. Unter dieser Annahme hätte der Wert $k_1 = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$

Digitized by Google

während des ganzen Verlaufs konstant bleiben müssen (a Anfangsmenge, x die zur Zeit t schon zerstörte Menge des Ferments). Der Versuch zeigt aber, daß das nicht der Fall ist. k_1 hat durchweg einen Gang, und zwar fällt es mit der Zeit. Da aber doch die Zerstörungsgeschwindigkeit irgendeine Funktion der noch vorhandenen Fermentmenge sein mußte, versuchten wir, ob sie nicht irgendeiner Potenz der jeweilig vorhandenen Fermentmenge proportional sei. Wir setzten also:

$$\frac{dx}{dt} = k_n (a - x)$$

und probierten den zutreffendsten Wert für n aus. Das Integral dieser Gleichung ist

$$k_n = \frac{1}{n\,t} [(a - x)^{1-n} - x^{1-n}] .$$

Es zeigte sich nun, daß ein ganzzahliger Wert für n überhaupt nicht zu einer befriedigenden Konstanz der k-Werte führt. Die Werte für k_1 fallen beträchtlich; die Werte für k_2 stimmen zwar für kürzere Umsätze besser, steigen aber bei längerem Verfolgen der Zerfallsreaktion deutlich an. Am besten erwies sich die Annahme $n = 1{,}5$. Unter dieser Voraussetzung zeigt k auch bei den Versuchen mit den größten Umsätzen, bis zu 96% der Gesamtfermentmenge (Nr. 1. 2 in Tab. II), keinen Gang, und die Konstanz ist recht befriedigend. Die Konstante $k_{1,5}$ hätte demnach die Form: $1{,}5 \cdot k_{1,5} = \frac{1}{t}\left(\frac{1}{\sqrt{a - x}} - \frac{1}{\sqrt{a}}\right)$. Berechnet man in einer Versuchsreihe aus dem Mittelwert dieser Konstanten den Wert von $a - x$, so zeigt sich in gut gelungenen Versuchen durchweg eine Übereinstimmung mit dem gefundenen Wert innerhalb von 5, allerhöchstens 10%, also kaum schlechter, als es nach den Fehlergrenzen der Methode zu erwarten ist.

Soweit es sich feststellen läßt, bleibt das Gesetz das gleiche für beliebige h, obwohl der absolute Wert dieser Konstanten sich gewaltig mit der h ändert. Bei gegebener h ist der Wert für dieses k unabhängig von der Anfangskonzentration des Ferments. Hieraus können wir schließen, daß die Zerstörungsprodukte des Ferments ohne Einfluß auf den Gang der Zerstörung sind. Wir sind daher berechtigt, den jeweiligen Wert von $k_{1,5}$ als ein Maß für die Geschwindigkeit der Zerstörung des Ferments zu betrachten.

Digitized by Google

8. Die Abhängigkeit der Zerstörungsgeschwindigkeit von der h.

Fragen wir nun, in welcher Weise die Zerstörungsgeschwindigkeit von der h abhängt. h wurde in den Versuchen dadurch in verschiedener Weise festgelegt, daß verschiedene Mischungen von prim. und sek. Phosphat zugegeben wurden. In den jeweils im Versuch befindlichen Lösungen wurde dann eine elektrometrische Bestimmung von p_H ausgeführt. Diese Messungen geschahen bei einer Zimmertemperatur von 16—18° und wurden durch Umrechnung für die Versuchstemperatur korrigiert. In einem reinen Phosphatpuffer wird p_H pro Grad um 0,0038 kleiner[1]). In unseren Lösungen haben wir zwar keinen reinen Phosphatpuffer, denn ihr p_H ist um 0,2—0,4 kleiner, als dem Phosphatpuffer entspricht. Da es sich aber doch nur um eine kleine Korrektur handelt, haben wir ein Recht, diesen Umstand zu vernachlässigen und den Temperaturkoeffizienten von p_H einfach gleich dem eines reinen Phosphatpuffers zu setzen.

Wir haben eine Gruppe von Versuchsreihen bei 25,5° angestellt. Für diese beträgt demnach die Korrektur für $p_H = -0{,}03$, und für eine zweite Gruppe von Versuchsreihen bei 36,8° beträgt sie $-0{,}076$. Aus einem bestimmten, in einem späteren Abschnitt zu erörternden Anlaß legen wir der weiteren Rechnung nicht p_H, sondern p_{OH} zugrunde nach der Gleichung $p_{OH} = p_{kw} - p_H$. Die Werte für p_{kw} wurden der Tabelle aus L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration, S. 8, entnommen und wurden gesetzt: für 25,5° 13,88 und für 36,8° 13,505. Auf diese Weise finden wir nun folgendes.

Die Zerstörungsgeschwindigkeit des Labs ist in einem unerwartet hohen Maße von der oh abhängig. Von einfacher Proportionalität ist gar keine Rede. Es wurde nun der Versuch gemacht, ob die Geschwindigkeit irgendeiner konstanten Potenz der oh proportional sei. Es wurde also gesetzt

$$1{,}5 \cdot k_{1,5} = A \cdot oh^n ,$$

wo A und n Konstanten sind. Diese Gleichung ergibt logarithmiert

$$p_{(1,5 \cdot k_{1,5})} = p_A + n \cdot p_{oh} ,$$

wo das Funktionszeichen p den negativen Wert des Logarithmus bedeutet. Das ist die Gleichung einer geraden Linie. Die Tangente

[1]) L. Michaelis und T. Garmendia, Diese Zeitschr. 67, 431. 1914.

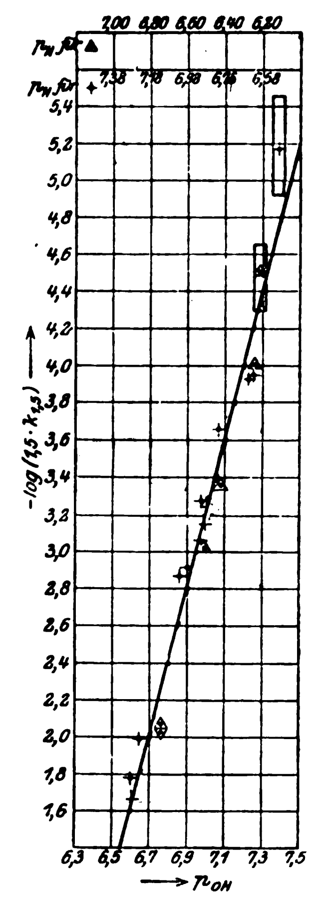


Abb. 1. Abszisse p_{OH}. Die den p_{OH} entsprechenden p_H sind oben in der Abbildung abgetragen; + für 25,5°, △ für 36,8°. Ordinate: $p_{(1,5\,.\,k_{1,5})}$, d. i. der negative Logarithmus der im Text definierten Geschwindigkeitskonstante $1,5 \cdot k_{1,5}$. + Versuche bei 25,5°, ▲ Versuche bei 36,8°.

Tabelle III zum Diagramm.

(Berechnet nach $p_{OH} = \frac{1}{4} p_{1,5\,.\,k_{1,5}} + 6,20$.)

Nr.	$p_{1,5\,.\,k_{1,5}}$	p_{OH} berechnet	p_{OH} gefunden
1	5,19	7,50	7,38
2	3,95	7,19	7,25
3	3,94	7,24	7,24
4	3,83	7,16	7,14
5	3,66	7,18	7,06
6	3,22	7,00	7,03
7	3,16	6,99	7,01
8	3,20	7,00	7,01
9	3,29	7,02	6,99
10	3,07	6,99	6,98
11	2,92	6,95	6,90
12	2,84	6,87	6,86
13	1,99	6,70	6,65
14	1,66	6,61	6,60
15	1,78	6,66	6,60

Versuche bei 25,5°.

Nr.	$p_{1,5\,.\,k_{1,5}}$	p_{OH} berechnet	p_{OH} gefunden
1	4,484	7,32	7,28
2	4,055	7,21	7,25
3	3,367	7,04	7,09
4	3,041	6,96	7,01
5	3,2899	7,02	6,99
6	2,072	6,72	6,76
7	2,201	6,75	6,75

Versuche bei 36,8°.

ihres Neigungswinkels ist n (Tabelle III, IV und V). Im Diagramm ist $p_{1,5\,.\,k_{1,5}}$ auf die Ordinate, p_{OH} auf die Abszisse abgetragen. Sämtliche Punkte liegen mit einer Genauigkeit, welche die Fehlergrenzen kaum übersteigen dürfte, auf einer Geraden, welche sehr steil verläuft. Versuche mit hoher und niederer Anfangskonzentration des Ferments fügen sich dieser

Digitized by Google

Tabelle IV.

Nr.	Temp °C	p_H gemessen	p_{OH}	t Min.	$a-x$	1,5 $k_{1,5}$	Mittelwert von 1,5 k_{15} (in Klammern der zugehörige Logarithmus)
1	25,5	6,53		0	310		
		korr.		225	300	0,0000064	0,0000064
		6,50	7,38	266	292		(−5,19)
2	25,5	6,65		0	288		
		korr.		83	200	[0,000143]	
		6,62	7,25	122	186,0	0,000119	
				251	133,3	0,000110	
				327	111,5	0,000109	0,000113
				378	95,8	0,000114	(−3,95)
3	25,45	6,67		0	330		
		korr.		34	271	[0,0001706]	
		6,64	7,24	76	227,4	0,0001500	
				126	203	0,0001166	
				204	170,5	0,0001070	0,000116
				311	143,9	0,0000913	(−3,94)
4	25,6	6,77		0	174		
		korr.		46,5	146,4	0,0001462	
		6,74	7,14	94	122,5	0,0001554	0,000147
				136	111,4	0,0001396	(−3,83)
5	25,6	6,85		0	353		
		korr.		17	315	[0,000181]	
		6,82	7,06	81	200	0,000214	
				145	135,3	0,000223	0,000218
				208	103,0	0,000218	(−3,66)
6	25,4	6,88		0	257		
		korr.		15	190,5	0,000654	
		6,85	7,03	33	150	0,000778	
				61,5	112	0,000540	0,000596
				91,5	78	0,000553	(−3,22)
				148,5	58,8	0,000457	
7	25,45	6,90		0	3940		
		korr.		30	750	0,000695	
		6,87	7,01	61	281	0,000716	0,000696
				97	150	0,000678	(−3,16)
8	25,5	6,90		0	4272		
		korr.		9,5	[2030]	[0,0007418]	
		6,87	7,01	19,5	1354	0,0006150	
				49,5	457	0,0006230	0,000625
				88,5	195	0,0006365	(−3,20)
9	25,6	6,92		0	264		
		korr.		26,5	184	0,000465	
		6,89	6,99	44,0	137,6	0,000538	
				75,0	94,4	0,000550	0,000508
				124,5	68,8	0,000481	(−3,29)
10	25,5	6,93		0	3330		
		korr.		5,5	1875	0,00107	
		6,90	6,98	13,5	1080	0,000969	
				29,2	393	0,00110	0,001075
				47,0	194	0,00116	(−3,07)

Digitized by Google

Tabelle IV (Fortsetzung).

Nr.	Temp. °C	p_H gemessen	p_{OH}	t Min.	$a-x$	1,5 $k_{1,5}$	Mittelwert von 1,5 $k_{1,5}$ (In Klammern der zugehörige Logarithmus)
11	25,6	7,01					
		korr.					
		6,98	6,90	0	194,5		
				9	146,5	0,00122	
				21	110,3	0,00112	
				39	68,8	0,00125	0,00120
				60	48,9	0,00119	(−2,92)
				120	21,0	0,00122	
12	25,5	7,05		0	201		
		korr.		4,25	153,4	[0,00239]	
		7,02	6,86	14,0	119,7	0,00149	
				18,25	111,6	0,00132	0,00134
				80,0	35,3	0,00122	(−2,87)
13	25,45	7,26		0	300		
		korr.		3,2	125	0,00992	
		7,28	6,65	7,37	62,5	0,00993	
				13,67	25,8	0,01017	0,01033
				17,37	15,2	0,01145	(−1,99)
				26,93	8,25	0,01078	
14	25,6	7,30		0	161		
		korr.		1,5	96	[0,016]	
		7,27	6,61	11,5	9,26	0,0217	0,0217
				30,0	ca. 1	[0,03]	(−1,66)
15	25,5	7,31		0	261		
		korr.		2,08	116	0,0149	
		7,28	6,60	5,75	46	0,0186	0,0166
				9,2	22,2	0,0162	(−1,78)

Tabelle V.

Nr.	Temp. °C	p_H gemessen	p_{OH}	t Min.	$a-x$	1,5 $k_{1,5}$	Mittelwert von 1,5 $k_{1,5}$ (In Klammern der zugehörige Logarithmus)
1	36,8	6,30		0	3046		
		korr.		44	2610	0,0000348	
		6,224	7,28	102,5	2220	0,0000310	0,0000328
				155,5	1875	0,0000325	(−4,484)
2	36,8	6,33		0	373		
		korr.		50	314	0,0000924	
		6,254	7,25	115	[293]	[0,0000578]	0,0000881
				259	185,3	0,0000838	(−4,055)
3	36,8	6,49		0	323		
		korr.		21	234,7	0,000453	
		6,414	7,09	45	169,4	0,000470	
				64	138,0	0,000465	0,000430
				105	110,0	0,000378	(−3,367)
				206	55,0	0,000385	

Digitized by Google

Tabelle V (Fortsetzung).

Nr.	Temp. °C	p_H gemessen	p_{OH}	t Min.	$a-x$	1,5 $k_{1,5}$	Mittelwert von 1,5 $k_{1,5}$ (in Klammern der zugehörige Logarithmus)
4	36,8	6,57		0	220		
		korr.		17	146,5	0,000888	
		6,494	7,01	30,5	110,3	0,000909	0,000909
				46,0	83,7	0,000909	(−3,041)
				62,0	61,3	0,000972	
5	36,8	6,59		0	2648		
		korr.		31	832	0,000492	
		6,514	6,99	45,5	542	0,000517	0,000513
				68,0	317	0,000531	(−3,2899)
6	36,8	6,82		0	220		
		korr.		6	77,6	0,00767	
		6,744	6,76	18	22	0,00810	0,00848
				24	11	0,00967	(−2,072)
7	36,8	6,83		0	2056		
		korr.		8,1	319	0,00591	
		6,754	6,75	14,6	126	0,00649	0,00629
				20,6	74	0,00647	(−2,2014)

Geraden gleich gut an. Aus ihrem Neigungswinkel ergibt sich n am besten gleich 4. Es ist nicht möglich zu entscheiden, ob die Linie genau eine Gerade ist oder nur zufällig in dem engen Bereich von p_H, in dem die Messung der Geschwindigkeit überhaupt möglich ist, nur angenähert eine Gerade ist. Die beiden obersten Punkte scheinen allenfalls zu ergeben, daß die Kurve mit zunehmender Acidität steiler wird. Jedoch können wir diesen beiden Punkten kein großes Gewicht beilegen; denn hier ist die Zersetzungsgeschwindigkeit so klein, daß eine Versuchsdauer von etwa 6—8 Stunden nur sehr kleine Umsätze ergibt, eine Versuchsdauer über 1 Tag durch Bakterienwachstum aber zu einer bedeutenden Änderung von p_H führt (um 0,2—0,3). Die eingezeichneten beiden obersten Punkte sind aus kurzfristigen Versuchen geschätzt. Die Fehlergrenzen der Schätzung sind durch die die Punkte umgebenden Rechtecke angedeutet.

Sehr auffällig ist nun, daß die Punkte für 36,8° sich denen für 25,5° so gut einfügen, daß man einen sicheren Einfluß der Temperatur auf die Zerstörung des Labferments nicht erkennen kann. Das ist gewiß ein ganz unerwartetes Resultat, welches mit der van't Hoffschen Temperaturregel nicht übereinstimmt.

Digitized by Google

Diese Betrachtung gilt jedoch nur, solange wir die Geschwindigkeiten bei verschiedenen Temperaturen für die gleiche *oh* betrachten. Wollten wir die Geschwindigkeit für gleiche *h* vergleichen, so wäre das Resultat wegen des hohen Temperaturkoeffizienten von $h \cdot oh$ ein ganz anderes. Für gleiche p_h würden sich die Logarithmen der Konstanten um 1,50 unterscheiden; die Konstanten selbst würden sich also verhalten wie 1 zu 31,6. Bei dieser Betrachtungsweise würden wir also einen ganz unerhört großen Temperaturkoeffizienten der Geschwindigkeit erhalten und eine Abweichung von der van't Hoffschen Regel im umgekehrten Sinne wie vorher.

Das Gesetz über die Zerstörungsgeschwindigkeit des Labferments läßt sich nunmehr folgendermaßen formulieren. Ist *x* die zur Zeit *t* vorhandene Fermentmenge, so ist

$$-\frac{dx}{dt} = k \cdot x^{\frac{3}{2}} \cdot oh^4 ,$$

wobei wir es offen lassen, ob die Exponenten aus irgendeiner nicht erkennbaren inneren Ursache genau den angegebenen Wert haben oder ob diese Werte nur empirische Näherungswerte sind; wobei wir es ferner offen lassen, für welches Bereich von *oh* dieses Gesetz wirklich gilt. Wegen der außerordentlichen Steilheit der Funktion können wir sie nur für ein sehr enges Bereich von *oh* experimentell prüfen, aber für dieses Bereich gibt die Formel die Tatsachen gut wieder. Der innere Sinn dieses Gesetzes ist vorläufig völlig unklar.

III. Betrachtungen über den Temperaturkoeffizienten.

Die Frage nach der Größe des Temperaturkoeffizienten unserer Reaktion kann somit auf zweierlei Weise gestellt werden. Entweder kann man fragen, wie ändert sich die Geschwindigkeit der Reaktion, wenn man bei variierter Temperatur die Konzentration aller an der Reaktion beteiligten Molekülgattungen, also auch die der OH'-Ionen konstant hält. Die Antwort ist: sie ändert sich beinahe gar nicht. Den so definierten Temperaturkoeffizienten wollen wir den „physikalischen" nennen. Oder man kann fragen, wie ändert sich die Geschwindigkeit, wenn man eine gegebene Lösung von Lab in einem gegebenen Phosphatpuffer erwärmt (wobei sich also die *oh* ändert). Die Antwort ist: für 10° Temperaturdifferenz wird die Geschwindigkeitskon-

Digitized by Google

stante mehr als verdreißigfacht. Nach der Arrheniusschen Formel umgerechnet würde das einen Koeffizienten μ = etwa 56 000 ergeben. Alle Körperflüssigkeiten verhalten sich nun insofern ebenso wie ein Phosphatpuffer, als sie Gemische einer freien schwachen Säure mit ihren Salzen darstellen. Diese Säure pflegt Kohlensäure, prim. Phosphat oder Eiweiß zu sein, welches ja bei der Reaktion der Körperflüssigkeiten sich fast stets wie eine Säure verhält, denn der isoelektrische Punkt der meisten Eiweißkörper liegt bei einer größeren *h* als die *h* der Gewebssäfte ist. Da nun die Dissoziationskonstante der Säuren viel weniger von der Temperatur abhängt als die des Wassers, so können wir mit erster Annäherung sagen, daß in solchen Puffern die *h* von der Temperatur beinahe gar nicht abhängt, die *oh* aber sehr stark. Wir können also den Temperaturkoeffizienten für eine gegebene *h* als den „physiologischen" Temperaturkoeffizienten bezeichnen. Dieser ist also, wie wir sahen, für unsere Reaktion sehr groß.

Es fragt sich nun, welche Beziehung denn dieser Alkalitätstemperaturkoeffizient auf die Labzerstörung zu dem von Madsen und Walbum beobachteten Temperaturkoeffizienten der Labzerstörung in rein wässeriger Lösung ohne Berücksichtigung der *h* hat. Diese verglichen die Geschwindigkeit der Zerstörung des Labs in rein wässerigen Lösungen bei verschiedenen, höheren Temperaturen miteinander und fanden Temperaturkoeffizienten der gleichen Größenordnung wie wir bei der Alkalizerstörung bei niederen Temperaturen. Sie fanden bei einem Labpräparat μ = 91 000, bei einem zweiten μ = 58 000. Nun ist eine solche rein wässerige Lösung eines Labpräparats, welche annähernd neutral oder soeben sauer reagieren dürfte, infolge ihres Gehalts an Eiweiß und vielleicht auch Phosphaten, als ein Puffer zu betrachten, dessen *h* von der Temperatur nur wenig abhängt. Wir haben also in einer solchen Lösung den „physiologischen" Temperaturkoeffizienten zu erwarten. Nehmen wir beispielsweise in einer solchen Lösung $p_h = 6$ an. Bei 50° können wir p_{kw} etwa = 13,15 setzen, p_{oh} daher in dieser Lösung = 7,15. Nehmen wir wiederum den „physikalischen" Temperaturkoeffizienten als verschwindend klein an, so ergibt sich daraus die Zerstörungsgeschwindigkeit in dieser Lösung bei 50° ebenso groß wie bei gleichem p_{oh} für eine beliebige Versuchstemperatur. Wir entnehmen

Digitized by Google

nun aus dem Diagramm (S. 74), daß die Zerstörung bei $p_{oh} = 7{,}15$ schon sehr beträchtlich ist. Die Zerstörung bei 50° für $p_h = 6$ ist ebenso groß, wie die bei 25° für $p_h = 6{,}73$[1]). Temperaturerhöhung bewirkt dasselbe wie Alkalisierung; es ist gleichgültig, ob wir die OH′ durch Erwärmen oder durch Zusatz von Lauge vermehren. In beiden Fällen beobachten wir nur die Wirkung der OH′ auf das Ferment.

IV. Vergleich der Zerstörung von Lab und Pepsin.

Mit Rücksicht auf die viel erörterte Frage nach der Identität von Lab und Pepsin war es von Interesse festzustellen, ob die Zerstörung von Lab und Pepsin parallel verläuft. Zu diesem Zwecke bedürfen wir zunächst einer Methode zur Bestimmung des Pepsins, welche an Genauigkeit die Methode der Labbestimmung wenigstens einigermaßen erreicht. Wir glauben nicht, daß eine der vorhandenen Methoden die Bedingung erfüllt, eine relative Bestimmung der Pepsinmenge auch nur bis auf 20% des Gesamtwerts zu erreichen.

Die viel benutzte Mettsche Methode erfüllt unsere Ansprüche nicht völlig. Wenn die übrigens durchaus nicht immer eingehaltene Vorsichtsmaßregel beobachtet wird, daß man alle Versuche mit Mettschen Röhrchen bei einer genau fixierten h vor sich gehen läßt, so kann zwar aus der Länge der verdauten Eiweißschicht ein Schluß auf die Fermentmenge gemacht werden. Ob aber dabei die von uns gewünschte Genauigkeit erreicht werden kann, erscheint fraglich.

Auch die für klinische Zwecke ausreichenden Methoden von Jacoby und Fuld-Groß entsprechen nicht unseren Anforderungen an Genauigkeit, weil es nicht mit genügender Schärfe möglich ist, dasjenige Röhrchen zu bestimmen, in welchem die Aufhellung soeben vollkommen ist. In der Beurteilung des Resultats steckt ein subjektives Moment, welches nicht zu vernachlässigen ist, wenn es sich um sehr genaue Bestimmungen handelt.

Wir glauben daher, daß nur eine solche Methode zu einer wirklich genauen Fermentbestimmung geeignet ist, welche auf einem ähnlichen Prinzip basiert wie die oben angegebene Lab-

[1]) Bei 25° entspricht $p_h = 6{,}73$ einem $p_{oh} = 7{,}15$.


Digitized by Google

methode. Diese Methode muß darin bestehen, daß von der zu untersuchenden Fermentlösung durch einen Reihenversuch diejenige Verdünnung experimentell ausprobiert wird, welche bei genau festgestellter h irgendein Eiweiß mit genau derselben Geschwindigkeit verdaut, wie eine stets reproduzierbare Kontrollfermentlösung. Diese Geschwindigkeit darf aber nicht wie bei Jacoby und Fuld-Groß nur danach beurteilt werden, zu welcher Zeit die Aufhellung beendet ist, denn gerade die Endstadien der Verdauung verlaufen asymptotisch, sondern die Vergleichung muß in einem früheren Stadium der Verdauung geschehen und womöglich nicht nur an einem Punkte, sondern Schritt für Schritt verfolgt werden. Beim Lab liegen die Verhältnisse insofern einfacher, als die Beobachtung eines bestimmten Stadiums der Fermentwirkung ausreichend ist, nämlich des Punktes an dem eine sichtbare Flockung eintritt, denn dieser Punkt ist sehr scharf zu bestimmen. Er wird nicht asymptotisch erreicht, wie das Ende der Pepsinverdauung, sondern plötzlich. Beim Pepsin muß das Bestreben somit dahin gehen, eine Methode zu finden, welche die Vergleichung des Fortgangs der Verdauung kontinuierlich gestattet. Dieses Prinzip wandten wir in folgender Weise an.

Wenn man irgendeine Eiweißlösung mit Sulfosalicylsäure ansäuert, so erhält man infolge der großen Stärke dieser Säure ganz leicht die zur Pepsinwirkung optimale h. Gleichzeitig wird das Eiweiß durch die Säure ausgeflockt oder bei passend gewählter Ansäuerung in eine milchartige, nicht sedimentierende Suspension verwandelt. Diese milchweiße Flüssigkeit wird durch die Pepsinverdauung allmählich bis zur völligen Durchsichtigkeit aufgehellt. Unsere Methode besteht nun einfach darin, daß in einem Reihenversuch diejenige Verdünnung der zu untersuchenden Pepsinlösung aufgesucht wird, bei der die Aufhellung Schritt für Schritt übereinstimmt mit der in einer Kontrollfermentlösung. Die Innehaltung der gleichen h in allen Versuchsröhrchen wird dadurch gewährleistet, daß die Sulfosalicylsäure-Eiweißmischung in einem ziemlichen Überschuß zu der Fermentlösung zugegeben wird, so daß das etwaige Säurebindungsvermögen der mehr oder weniger verdünnten Fermentlösung praktisch nicht mehr in Betracht kommt. Die Ausführung der Methode gestaltet sich folgendermaßen.

Digitized by Google

Methode der Pepsinbestimmung.

1. Die Herstellung der Sulfosalicylsäureeiweißlösung.

Ein mit destilliertem Wasser 12fach verdünntes menschliches Blutserum oder 15fach verdünntes Hammelserum wird unter Umrühren mit so viel einer 10proz. Sulfosalicylsäurelösung versetzt, daß Kongopapier gerade eben ein wenig violett gefärbt wird. Das Papier soll nicht wirklich blau werden wie etwa in normalem Magensaft. Der Indicator hat in dieser Lösung eine andere Nuance als im Magensaft bei gleicher h. Eine eben gerade deutliche Violettfärbung entspricht etwa $p_H = 2$ bis 1,8, also dem Optimum der Pepsinverdauung. Die Eiweißlösung ist dann dick milchig getrübt, aber ohne sedimentierende Flocken. Für die Menge der Sulfosalicylsäure ist ein gewisser Spielraum erlaubt. Sie beträgt etwa $^2/_3$ bis $^3/_4$ der Menge des jeweils angewandten unverdünnten Serums. Wesentlich soll diese Menge nicht überschritten werden, denn dann tritt eine Flockung ein, welche allmählich sedimentiert. Das hat den Nachteil, daß erstens das Optimum für die Verdauung schon etwas überschritten ist, der Versuch daher länger dauert, und zweitens daß während des Versuchs ein wiederholtes Aufschütteln erforderlich wird.

2. Die Herstellung der Pepsinkontrolle.

Die Herstellung der Pepsinkontrolle ist schon beim Lab beschrieben worden. Es ist die 100fache Verdünnung der Glycerinstammlösung, während die 10000fache Verdünnung die Labkontrolle war.

3. Die Anstellung des Versuchs.

In eine Reihe von Reagensgläschen wird je 1 ccm der Fermentlösung in verschiedenen Verdünnungen und je 5 ccm der Sulfosalicylsäureeiweißmischung gebracht, ebenso wird 1 ccm der Kontrollfermentlösung mit 5 ccm der Eiweißmischung vermischt. Die Gläschen werden dann in ein Wasserbad von 38—40° gebracht und die Aufhellung beobachtet. Wie bei der Labbestimmung werden in einem Vorversuch erst gröbere Abstufungen der Fermentverdünnung hergestellt, in einem zweiten werden feinere Abstufungen gewählt. Die feinere Reihe setzten wir in der Regel in folgender Weise an. Von derjenigen Fermentmischung, welche sich im Vorversuch als eben noch zu stark erwiesen hatte, werden in eine Reihe von Gläschen je 1,0, 0,8, 0,64, 0,52 ccm

Digitized by Google

eingefüllt, mit Wasser auf 1,0 ccm aufgefüllt und dazu je 5 ccm der Eiweißlösung gegeben. Die Aufhellung ist in der Regel in 10 Minuten so weit vorgeschritten, daß Unterschiede in der Aufhellung, selbst zwischen den einzelnen Röhrchen der feineren Reihe, deutlich geworden sind. Verfolgt man nun die Aufhellung noch einige Minuten weiter, so wird man niemals im Zweifel sein, welche Verdünnung man der Kontrolle gleichzusetzen hat. Diejenige Verdünnung, welche der Kontrolle parallel geht, soll nach unserer Definition 1 Pepsineinheit enthalten.

In gut gelungenen Versuchen dürfte die Genauigkeit dieser Bestimmung der Labbestimmung nicht viel nachstehen. Wir glauben, die Reproduzierbarkeit der Versuche auf weniger als 20% des Gesamtwerts veranschlagen zu können. Was nun die Bewertung der erhaltenen Zahlen betrifft, so ist sie um so höher zu bemessen, je fermentreicher die zu untersuchende Lösung ist. Bei sehr fermentarmen Lösungen ist diejenige Verdünnung, welche der Kontrollösung parallel geht, sehr gering. Infolgedessen enthält sie eine relativ noch große Menge von Peptonen und sonstigen säurebindenden Verunreinigungen, welche dahin wirken können, daß sie die *h* der Eiweißsulfosalicylsäuremischung etwas erniedrigen. Auch ist bei peptonreicheren Pepsinlösungen zu berücksichtigen, daß unter Umständen die Verteilung des Pepsins zwischen dem zu verdauenden sulfosalicylsauren Eiweiß und dem diesem von vornherein beigemengtem Pepton zu ungunsten des ersteren in Rechnung zu ziehen ist, so daß trotz guter Reproduzierbarkeit der Versuche die erhaltenen Zahlen kein genauer Maßstab für die wirklich vorhandenen Pepsinmengen sind. Alle diese Umstände tragen dazu bei, daß in fermentarmen Lösungen die erhaltene Genauigkeit wohl nicht ganz die der Lablösung erreichen dürfte. Lösungen, welche weniger als eine Pepsineinheit enthalten, könnte man einfach in der Weise messen, daß man als Kontrolle eine entsprechend verdünnte Vergleichslösung benutzt. Solche Versuche sind zwar leicht ausführbar und geben immerhin einigermaßen reproduzierbare Resultate; jedoch sind die erhaltenen Pepsinwerte in der Regel unwahrscheinlich niedrig; sie weichen also in dem theoretisch zu erwartenden Sinn von der Wirklichkeit ab. Sobald aber eine Lösung mehrere Pepsineinheiten im ccm enthält, sind solche Abweichungen nicht zu befürchten.

Digitized by Google

Wegen dieser Schwierigkeiten verfolgten wir die Zerstörung des Pepsins nicht in derselben ausführlichen Weise wie beim Lab. Der für die Versuche notwendige Zusatz von Puffern würde bewirken, daß solche Gemische, wenn die Fermentzerstörung einigermaßen fortgeschritten und daher der mit der Kontrolle gleich gehende Verdünnungsgrad gering sein würde, nicht mehr belanglos wären für die *h* der Sulfosalicylsäureeiweißmischung. Um diese Schwierigkeit zu vermeiden, schlugen wir folgenden Weg ein.

Die Fermentlösungen wurden einfach mit verschiedenen Mengen von $^{n}/_{1}$ oder $^{n}/_{10}$ Ammoniak versetzt und nach etwa 1 Minute mit $^{n}/_{1}$- oder $^{n}/_{10}$-Salzsäure ein wenig überneutralisiert. Nunmehr wurde in dieser Lösung einerseits eine Labbestimmung, andererseits eine Pepsinbestimmung vorgenommen. Die ursprüngliche Fermentlösung enthielt auf je 1 Pepsineinheit in verschiedenen Versuchen 100, 105, 114 Labeinheiten. Unser Kontrollferment enthält definitionsgemäß auf je 1 Pepsineinheit 100 Labeinheiten. Das Verhältnis von Pepsin und Lab ist also in unserem Versuchspräparat und in unserer Kontrollösung innerhalb der Fehlergrenzen das gleiche. Nach Zusatz von verschiedenen Mengen Ammoniak und Salzsäure fanden sich folgende Mengen von Lab und Pepsin.

Tabelle VI.

Vergleich der Zerstörung von Lab und Pepsin durch Alkali.

Nr.	Zusatz von NH_3 in ccm	Dauer der Einwirkung in Min.	Pepsin *E* im ccm	% des ursprüngl. Gehalts	Lab *E* im ccm	% des ursprüngl. Gehalts	Verhältnis von Pepsin zu Lab
1	0	0	14,28	100	1500	100	1:105
2	0,28 $^{n}/_{1}$	1	8,2	57	1038	69	1:125
3	0,3 $^{n}/_{1}$	1	7,05	49	588	39,2	1:83,4
4	0,35 $^{n}/_{1}$	1	0,5	0,35	70,7	0,47	1:141
5	0,4 $^{n}/_{1}$	1	0	—	8	0,53	—
6	8,0 $^{n}/_{10}$	1	11,4	82,6	960,0	64	1:84
7	3,2 $^{n}/_{10}$	1	9,36	65	728,2	48,5	1:77
8	3,5 $^{n}/_{10}$	1	4,8	33	538,0	35,86	1:112
9	3,7 $^{n}/_{10}$	1	8,14	57	772,6	51,5	1:95

In diesen Versuchen wurde auf Einhaltung einer konstanten Temperatur oder genaue Abmessung der Zeit der Alkalieinwirkung kein besonderer Wert gelegt. Infolgedessen ist z. B. in dem Versuch Nr. 8 weniger Ferment zerstört als in Versuch Nr. 4. Es kam uns nur darauf an, die jeweilig noch vorhandene Menge von Lab

Digitized by Google

und Pepsin miteinander zu vergleichen, und da zeigte sich, daß in allen Versuchen das Verhältnis von Lab und Pepsin innerhalb der Fehlergrenzen das gleiche geblieben war. Es schwankte nur zwischen 1 zu 77 und 1 zu 125, also nur um etwa ± 25% des zu erwartenden Mittelwertes von 1 zu 100. Nur in dem Versuch Nr. 4 fanden wir das Verhältnis 1 zu 141. Das ist aber gerade ein Versuch, in dem nur 0,5 Pepsineinheiten zur Bestimmung gelangten und wo, nach der obigen Erörterung, die Bestimmung des Pepsins voraussichtlich einen zu kleinen Wert geben mußte. Wir können daher behaupten, daß — soweit es die Fehlerquellen der Methoden zu beurteilen gestatten — die Zerstörung von Lab und Pepsin stets gleichen Schritt hält.

Diese Beobachtung ist von Interesse für die viel erörterte Frage nach der Identität von Lab und Pepsin. Wenn es gelungen wäre, einen selbständigen Verlauf der Zerstörung beider Fermente einwandfrei nachzuweisen, so wäre damit die Tatsache ihrer Verschiedenheit eindeutig erwiesen. Dies ist aber nicht gelungen.

Wir benutzten die Gelegenheit, um eine ähnliche Beobachtung mit einer anderen Methode der Fermentzerstörung zu machen, der partiellen Adsorption des Ferments durch Kaolin.

Tabelle VII.

Vergleich der Adsorption von Lab und Pepsin durch Kaolin.

Nr.	Pepsin Grübler 2 proz. Lösung in ccm	Kaolin in g	Lab E in ccm Pepsinlösung	Pepsin E in ccm Pepsinlösung	Lab : Pepsin
1	20	0	1600	12,45	133[2])
2	20	1	735	6,25	117
3	20	1	600	5,55	108
4	20	2	555	5,20	106
5	20[1])	1	47,6	0,5	95,2

Auch hier zeigt sich, daß innerhalb der Versuchsfehler das Verhältnis von Lab und Pepsin stets das gleiche bleibt.

Zusammenfassung.

Die Untersuchung befaßt sich mit der Zerstörung des Lab- und Pepsinfermentes durch Alkali. Es werden zunächst Methoden

[1]) 0,4 proz. Pepsinlösung.

[2]) Auch Versuch 1 aus Tabelle VI kann als Nullversuch hierzu betrachtet werden; hier ist der Wert 105.

Digitized by Google

zur quantitativen Bestimmung dieser Fermente ausgearbeitet. Sie beruhen darauf, daß durch Reihenversuche diejenige Verdünnung der zu untersuchenden Fermentlösung ermittelt wird, deren Wirkung zeitlich mit der einer stets gut reproduzierbaren Kontrollfermentlösung übereinstimmt. Für das Labferment wird die Gerinnung von mit Calciumchlorid versetzter Milch, für das Pepsin die allmähliche Aufhellung einer mit Sulfosalicylsäure getrübten Eiweißlösung beobachtet.

Wird die Wasserstoffionenkonzentration einer Lablösung durch ein Phosphatgemisch festgelegt, so ist bei saurer Reaktion bis herunter zu $p_H = 6$ das Ferment so gut wie unbeschränkt haltbar. Bei Annäherung an die neutrale Reaktion beginnt ziemlich plötzlich eine schnelle, zunächst aber noch mit meßbarer Geschwindigkeit vor sich gehende Zerstörung des Ferments. Bei weiterer Abnahme der h wird diese Geschwindigkeit schnell unmeßbar groß.

Der Verlauf der Labzerstörung bei gegebener h ist nicht der einer monomolekularen Reaktion. Vielmehr ist die Geschwindigkeit der Zerstörung in jedem Augenblick proportional der 1,5. Potenz der noch vorhandenen Fermentmenge. Das schon zerstörte Ferment beeinflußt den Gang der Zerstörung nicht.

Bei gegebener Fermentmenge ist die Zerstörungsgeschwindigkeit der 4. Potenz der $H^{\cdot}$-Konzentration umgekehrt oder der 4. Potenz der OH'-Konzentration direkt proportional.

Vergleicht man die Zerstörungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Temperaturen (25,5° und 36,8°), so wird die Zerstörungsgeschwindigkeit gar nicht geändert, wenn man Lösungen gleicher oh miteinander vergleicht („physikalischer" Temperaturkoeffizient). Dagegen wird die Geschwindigkeit um das Einunddreißigfache erhöht, wenn man Lösungen gleicher h miteinander vergleicht („physiologischer" Temperaturkoeffizient). Der Temperaturkoeffizient der Reaktion fällt demnach sehr verschieden aus, ob man ihn für konstante h oder für konstante oh angibt. Für konstante oh ist er praktisch gleich Null. Diese Formulierung ist rein physikalisch die berechtigtere, da man die OH', nicht aber die $H^{\cdot}$ als das zerstörende Agens annehmen muß. Die andere Formulierung hat aber eine größere physiologische Bedeutung, weil in Körperflüssigkeiten die h von der Temperatur fast unabhängig ist, nicht aber die oh.

Digitized by Google

Die Zerstörung des Pepsins durch OH′ erfolgt stets proportional der des Labs. Ein selbständiger Verlauf der Zerstörung eines dieser beiden Fermente ist nicht festzustellen. Auch durch partielle Adsorption an Kaolin konnte eine Disproportionierung von Lab oder Pepsin nicht festgestellt werden.

Die Kinetik der Labzerstörung durch OH′ läßt sich empirisch durch die Gleichung ausdrücken:

$$-\frac{dx}{dt} = k \cdot x^{\frac{3}{2}} \cdot [OH']^4 ,$$

wo x die zur Zeit t noch vorhandene Fermentmenge bedeutet.

Zur Narkosetheorie.

(Entgegnung an H. Winterstein und J. Traube.)

Von

Erich Knaffl-Lenz.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 7. Februar 1920.)

Traubes Hypothese, daß die Wirkung der Narkotica eine Funktion des Haftdruckes dieser Stoffe sei, veranlaßte eine Reihe von Untersuchungen, um festzustellen, ob die durch Temperaturveränderungen bedingten Änderungen der Oberflächenspannung mit der narkotischen Wirkungsstärke gleichsinnig verlaufen. Während v. Issekutz[1]) fand, daß die narkotische Kraft in allen Fällen symbat mit der Veränderung der Oberflächenspannung gehe, wurde von Knaffl-Lenz[2]), Unger[3]) und neuerdings von Winterstein[4]) gezeigt, daß dies nicht der Fall sei, sondern daß mit steigender Temperatur auch in jenen Fällen die Oberflächenspannung sich verringert, in welchen die narkotische Kraft bei Erhöhung der Temperatur abnimmt. Winterstein behauptet nun in seiner Veröffentlichung, daß Knaffl-Lenz ungleichmäßige Veränderungen fand, die keine Gesetzmäßigkeit erkennen lassen, und daß diese Resultate durch eine schon von Traube[5]) beanstandete fehlerhafte Versuchsanordnung bedingt seien.

Was die Einwände Traubes betrifft, so sind sie ungerechtfertigt, da man auch mit anders konstruierten Apparaten als dem Traubeschen Stalagmometer mindestens ebenso genaue Bestimmungen ausführen kann, wie aus den Versuchen anderer Forscher hervorgeht[6]). In meinen Versuchen wurden die Bestimmungen nicht mit dem Traubeschen Stalagmometer ausgeführt, da es für die Bestimmungen der Oberflächenspannung Lösung-Flüssigkeit nicht brauchbar gewesen wäre, sondern mit

Digitized by Google

einem nach den Angaben von Morgan abgeschrägten Rohre. Es wurde aus einer Reihe sorgfältigst zugeschliffener Röhren dasjenige ausgewählt, welches sich für diese Bestimmungen als ausgezeichnet brauchbar erwies.

Aus den von mir wiedergegebenen Zahlen ist auch ohne weiteres ersichtlich, daß die so erhaltenen Werte nur Differenzen von 0,1—0,3% aufweisen, also eine Genauigkeit, die sonst bei allen quantitativen Bestimmungen als ausreichend bezeichnet wird.

Auch die Behauptung Wintersteins, daß ich bei Änderung der Temperatur nur „so geringfügige Differenzen gefunden habe, daß sie augenscheinlich in die Fehlergrenzen fallen und die Genauigkeit der verwendeten Methodik als unzureichend erscheinen lassen", entspricht nicht den Tatsachen. Bei mehr als oberflächlicher Durchsicht der von mir gefundenen Zahlen ist ersichtlich, daß aus meinen Resultaten dieselben Schlüsse gezogen werden müssen, wie aus denen von Unger. Es ist daher überflüssig gewesen, diese Bestimmungen nochmals durch Frl. Hirschberg ausführen zu lassen.

Nach der Theorie nimmt die Oberflächenspannung wässeriger Lösungen gegen Luft bei Erhöhung der Temperatur um 1° um ca. 0,2% ab. In der folgenden Tabelle sind die von mir gefundenen und nach der Theorie berechneten Werte wiedergegeben.

Gewicht von 10 Tropfen.

	10°	20°	30°	
Wasser	0,4311	0,4242	0,4169	gefunden
	0,4327	—	0,4157	berechnet
Benzamid	0,4285	0,4189	0,4110	gefunden
	0,4272	—	0,4106	berechnet
Salicylamid	0,4226	0,4186	0,4106	gefunden
	0,4267	—	0,4103	berechnet
Chloreton	0,3702	0,3636	0,3565	gefunden
	0,3708	—	0,3563	berechnet
Diäthylsulfon	0,4268	0,4190	0,4131	gefunden
	0,4274	—	0,4106	berechnet
Urethan	0,4279	0,4205	0,4133	gefunden
	0,4289	—	0,4120	berechnet
Orthoform	0,4258	0,4163	0,4123	gefunden
	0,4246	—	0,4080	berechnet
Coffein	0,4265	0,4207	0,4128	gefunden
	0,4291	—	0,4123	berechnet

Digitized by Google

Die Werte wurden derart berechnet, daß zu bzw. von den bei 20° gefundenen Gewichten 2% addiert bzw. subtrahiert wurden. Obwohl die Temperaturen von 10° und 30° bei der gegebenen Versuchsanordnung nicht immer ganz genau eingehalten werden konnten, stimmen die Änderungen der Oberflächenspannung mit den geforderten Werten sehr gut überein und zeigen dieselbe Gesetzmäßigkeit, wie sie neuerdings Winterstein bestätigt hat.

Winterstein dürfte bei flüchtiger Durchsicht der auf Seite 71 meiner Arbeit wiedergegebenen Tabelle die Verhältniszahlen, gewonnen aus dem Tropfengewicht der Lösung dividiert durch die Tropfengewichte von destilliertem Wasser, mit den soeben besprochenen Werten verwechselt haben. Diese Zahlen zeigen keine Gesetzmäßigkeit und keine Proportionalität zwischen narkotischer Kraft und Oberflächenspannung bei Änderung der Temperatur.

Traube[7]) hält auf Grund seiner Untersuchungen daran fest, daß Narkotika quellungsfördernd wirken und nicht entquellend, wie ich angenommen habe. Seine Versuche beweisen jedoch nur, daß durch Zusatz von Narkoticis zu Gelatinegelen die Gelbildung verzögert wird. Die quellungsbefördernde Wirkung ist damit nicht bewiesen. Ein analoger Vorgang der Verlangsamung oder Sistierung von Krystallbildung aus gesättigten Lösungen bei Gegenwart von oberflächenaktiven Stoffen ist von Marc[8]) nachgewiesen. Meine Versuche an Gelatinen hält Traube „für derart roh", daß er die Schlußfolgerungen nicht anerkennen kann. Es ist seit langem bekannt, daß sowohl Muskeln als auch Gehirn, wenn sie Ätherdämpfen ausgesetzt werden, nicht unbeträchtliche Mengen von Flüssigkeit auspressen, daß also unter dem Einflusse der Ätherdämpfe eine Entquellung stattfindet. Diese Tatsache hat mich veranlaßt, die analogen Versuche an Gelatinegallerten zu machen, die zu demselben Resultat geführt haben. Ich benutzte dabei eine Methodik, wie sie von Hofmeister bei seinen Versuchen verwendet wurde. Es hat sich dabei gezeigt, daß Gelatinegele Äther aufnehmen, und es wurde daraus geschlossen, die Entquellung sei darauf zurückzuführen, daß das Quellungswasser Äther löst und daß Gelatine in ätherhaltigem Wasser eine geringere Quellungsfähigkeit besitzt als in reinem Wasser. Es handelt sich also um eine Verdrängung des

Digitized by Google

Wassers aus den Gelen durch Äther, somit um eine Entquellung (Dehydratation).

Traube führt ferner aus meinen Versuchen zu seinen Gunsten an, daß Blutkörperchen in Kochsalzlösungen mit geringem Alkoholzusatz bei nicht zu langer Einwirkung Volumsvergrößerung zeigen und meint, daß dies keine andere Deutung zuläßt, als daß hier die Narkotica eine quellende Wirkung ausüben. Aus meinen Versuchen geht aber hervor, daß alle untersuchten Narkotica eine Volumsabnahme der Blutkörperchen hervorrufen und die durch Hypotonie verursachte Quellung vollständig hemmen können. Bei Alkohol findet bei gewissen Konzentrationen wohl zuerst eine Volumsvergrößerung statt, die dann ins Gegenteil umschlägt, was seine Erklärung darin findet, daß der Alkohol schneller in die Blutkörperchen diosmiert als Wasser austritt. Die anfängliche Volumszunahme beruht auf Osmose, die Volumsabnahme auf Entquellung. Dieser Versuch ist daher nicht im Sinne Traubes zu verwerten. Die anfängliche Volumszunahme ist auch in den Versuchen mit anderen Narkoticis, bei denen das Volumen der aufgenommenen Mengen im Vergleich zum Alkohol sehr gering ist, nicht nachweisbar gewesen.

Auch eine Reihe von anderen Untersuchungen[9]), wonach narkotisch wirkende Substanzen bereits in sehr geringen Mengen Trübungen und Fällungen von hydrophilen Kolloiden hervorrufen, sprechen für eine Dehydratation. Auch die Befunde von Traube selbst[10]), wonach zwischen Fällungskraft und Oberflächenspannung ein Parallelismus besteht, lassen sich doch nur in diesem Sinne deuten. Ebenso zeigen die Versuche von Winterstein[11]) über die geringere Permeabilität von Muskelmembranen besonders für Wasser bei Gegenwart von Narkoticum, daß Narkotica entquellend wirken. Eine Verdichtung der Membran hat eine Verlangsamung der Diffusion und Osmose zur Folge, wie aus mehreren Arbeiten hervorgeht[12]). Besonders die Arbeiten von Flusin[13]) zeigen den engen Zusammenhang zwischen Osmose und Quellungszustand der Membran.

Eine reversible Permeabilitätsverminderung der Zelle durch Narkotika, sei es durch Quellung oder durch Absorption der Narkotika an die Zellkolloide bedingt, muß den Austausch der Reaktionsprodukte der Zelle verlangsamen oder hemmen. Die reversiblen chemischen Prozesse in der Zelle müssen nach dem

Digitized by Google

Massenwirkungsgesetz zum Stillstand gelangen und damit die Lebenstätigkeit der Zelle vorübergehend abschwächen oder aufheben, was zum Zustand der Narkose führt. Die initiale Erregung bei der Narkose würde dem Entquellungsprozesse selbst, der erhöhten Flüssigkeitsbewegung entsprechen.

Diese Erklärung ist besser fundiert als die von Traube gegebene, wonach durch Quellung und Volumsvergrößerung ein Druck auf die Ganglienzellen ausgeübt wird, der eine Ursache der Narkose sein soll. Es ist auch nicht bekannt, daß erhöhter Hirndruck Symptome der Narkose auslöst. Soweit die klinischen Erfahrungen reichen, ist gerade das Gegenteil der Fall.

Literatur.

[1]) v. Issekutz, Biochem. Zeitschr. 88, 213. 1918. — [2]) Knaffl-Lenz, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 84, 66. 1918. — [3]) Unger, diese Zeitschr. 89, 238. 1918. — [4]) Winterstein, diese Zeitschr. 100, 81. 1919. — [5]) Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. 176, 72. 1919. — [6]) Livingstone, R. Morgan, Eric Higgins, Zeitschr. f. physikal. Chemie 64, Livingstone, R. Morgan, F. Thomsen, Zeitschr. f. physikal. Chemie 78. — [7]) Traube, l. c., Traube und Köhler, Internat. Zeitschr. f. phys. chem. Biol. 1, 275. 1914. — [8]) Marc, Zeitschr. f. physikal. Chemie 81, 641. 1913. — [9]) Moore und Roaf, Proc. Roy. Soc. 78, 382; 77, 86; Battelli und Stern, diese Zeitschr. 52, 226. 1913; Warburg und Wiesel, Arch. f. d. ges. Physiol. 144, 465. — [10]) Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. 132, 511; 153, 276. — [11]) Winterstein, diese Zeitschr. 75, 47. 1916. — [12]) Voigtländer, Zeitschr. f. physiol. Chemie 3, 316. 1899; Kurt Meyer, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 7, 393. 1905; Bechhold und Ziegler, Zeitschr. f. physiol. Chemie 56, 105. 1906. — [13]) Flusin, Ann. de Chim. et de Phys. 13, 480. 1908.

Digitized by Google

Über die physiologische Verteilung des Zuckers auf Plasma und Körperchen.

Von

R. Brinkmann und Frl. E. van Dam.

(Aus dem physiologischen Institut der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 8. Februar 1920.)

In einer vor kurzem in dieser Zeitschrift erschienenen Arbeit[1]) teilen Falta und Richter-Quittner ihre Ansichten über die Verteilung der Glucose auf Plasma und Körperchen mit; daneben sind auch Chloride und Reststickstoffkörper berücksichtigt worden. Diese Autoren sind zu dem Schlusse gekommen, daß der Zucker sowohl im normalen wie im hyperglykämischen Blute sich ausschließlich im Plasma befindet und daß die Körperchen normalerweise zuckerfrei sind.

Die befolgte Methodik war die der Volumberechnung der Körperchen aus dem Zuckergehalt des Gesamtblutes und des Plasmas.

Kurze Zeit vor Falta und Richter-Quittner sind wir bereits in einer Arbeit[2]), die von den genannten Autoren nicht mehr berücksichtigt werden konnte, zu genau demselben Ergebnis gekommen. Wir fanden beim Froschblut und beim Menschenblut die Körperchen völlig zuckerfrei. Auch mittels osmotischer Experimente ließ sich der Nachweis führen, daß die normalen Körperchen des Menschen für Glucose impermeabel sind. Wir sind also ebenso wie jetzt Falta und Richter-Quittner von der Zuckerfreiheit der Körperchen überzeugt.

Wenn wir dann auch in dieser Zeitschrift noch auf das Problem zurückkommen, so ist es nicht, weil die genannten Versuche weiterer Bestätigungen bedürftig sind, sondern darum, daß wir

---

[1]) Diese Zeitschr. **100**, 140. 1919.

[2]) Arch. internat. de physiol. **15**, 105. 1919.

Digitized by Google

in unserer Arbeit auch den engen Zusammenhang zwischen den ersten Phasen der Gerinnung und der Permeabilität der Körperchen für Zucker gezeigt haben. Wir können unsere diesbetreffenden Resultate kurz in folgender Weise zusammenfassen:

1. Die roten Blutkörperchen des Frosches enthalten keinen Zucker, solange die Gerinnung des Blutes nicht angefangen hat.

2. Sobald aber dieselben Blutkörperchen einige Zeit mit dem gerinnenden Plasma in Berührung gewesen sind, sind sie permeabel für Zucker geworden.

3. Auch beim Menschen sind die Körperchen zuckerfrei, solange keine Gerinnung angefangen hat; mit den ersten Phasen der Gerinnung tritt aber Permeabilität für Zucker ein.

4. Die Impermeabilität der Körperchen wird nicht intakt gehalten im mit NaFl, Oxalat oder auch Hirudin versetzten Blute, weil diese Stoffe die allerersten Phasen der Gerinnung nicht hemmen.

Der Unterschied zwischen unseren Ergebnissen und denjenigen zahlreicher früherer Autoren, welche die Blutkörperchen mehr oder weniger permeabel fanden, konnten wir damit erklären, daß letztere die Körperchen niemals vor dem Eintritt der Gerinnung von dem Plasma trennten.

Falta und Richter-Quittner geben als Ursache des Permeabilitätseintritts den schädlichen Einfluß der gerinnungshemmenden Agenzien an (NaFl, Citrat, Oxalat, Kälte); als unschädliches Mittel bezeichnen sie das Hirudin.

Nebenbei bemerken sie, daß das Blut sofort zentrifugiert werden muß.

Wir sind geneigt nur diesem letzten Punkte Bedeutung zuzuschreiben. Einerseits konnten wir zeigen, daß Körperchen auch in NaFl-Blut ihre Impermeabilität behalten können, falls nur der Gerinnungsanfang verhindert wird; andererseits stellte es sich heraus, daß auch im Hirudinblut die Körperchen permeabel werden, wenn man nicht die ersten Phasen der Gerinnung aufzuschieben weiß.

Haben doch schon andere Autoren mit Hirudinblut gearbeitet und doch die Körperchen permeabel gefunden.

Ein bequemes Mittel zur Hemmung des Gerinnungsanfangs fanden wir in dem Durchperlen von irgendeinem indifferenten Gase durch die Flüssigkeit; während dieser Durchleitung, die wir

Digitized by Google

um eine halbe Stunde fortsetzten, werden die Blutkörperchen immer impermeabel gefunden, auch wenn man mit NaFl-Blut arbeitet.

Wenn Falta und Richter-Quittner auch im Serum nach der Gerinnung das totale Zuckerquantum fanden, können wir das nur dadurch erklären, daß in dem gerinnenden Blute Serum und Körperchen schnell getrennt wurden, und daß nur eine geringe Diffusion in die Körperchen möglich war. Auch beim Froschblut findet man allen Zucker in dem Serum des spontan geronnenen Blutes; wird letzteres jedoch defibriniert, so findet eine weit intensivere Diffusion in die Körperchen statt.

Eine genaue Analyse des Zusammenhangs zwischen Gerinnungsanfang und Permeabilitätseintritt können wir zur Zeit noch nicht geben. Vielleicht ist gerade diese Permeabilitätsänderung die Ursache des Gerinnungsanfangs; wir hoffen noch einmal auf diesen interessanten Zusammenhang zurückzukommen.

Digitized by Google

Über Veränderungen der Titrationsacidität, Oberflächenspannung und Farbe von Würze und vergorener Würze durch fraktionierte Ultrafiltration.

Von

Wilhelm Windisch und Walther Dietrich.

(Aus dem chemisch-technologischen Laboratorium der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Institut für Gärungsgewerbe, Berlin.)

(Eingegangen am 10. Februar 1920.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Bevor wir an die Anwendung der Titrationen mit oberflächenaktiven Stoffen als Indicatoren auf physiologische Flüssigkeiten, über die in der nächsten Abhandlung berichtet wird, herantreten konnten, mußten wir als Vorarbeit die Veränderungen, die eine physiologische Flüssigkeit durch Ultrafiltration im Sinne des Titels der Arbeit erfährt, verfolgen, und zwar in Berücksichtigung der Tatsache, worauf schon in früheren Arbeiten[1]) hingewiesen worden ist, daß man genaue Resultate mit den neuen Titrationsmethoden nur in Lösungen erhalten kann, die relativ capillarinaktiv sind. Nun sind aber die meisten physiologischen Flüssigkeiten ziemlich stark capillaraktiv, lassen sich aber durch Ultrafiltration inaktivieren, so daß man bei den neuen Titrationsmethoden in der Hauptsache mit Ultrafiltraten arbeiten wird.

Die folgenden Untersuchungen beziehen sich auf ungehopfte Bierwürzen und die daraus durch Reinzuchtgärung hergestellten Biere. Es sind die folgenden Resultate, wie man zunächst annehmen könnte, durchaus nicht nur von einseitiger Bedeutung für die Gärungsgewerbe, sondern es werden sich auch ganz ähnliche Feststellungen, wie wir sie an Würzen und Bieren machen konnten, an allen wäßrigen Auszügen, aus pflanzlichen und tierischen Geweben, z. B. Blutserum usw., machen lassen.

[1]) Diese Zeitschr. 97, 100, 101 usw.

Digitized by Google

Die Bierwürze ist bekanntlich ein etwa 8—12 proz. Extrakt des Gerstenmalzes, der aus letzterem durch Verzuckerung der Malzstärke und Peptisation der Eiweißstoffe bei bestimmten Temperaturen als den beiden Hauptprozessen neben einer großen Zahl sich abspielender Nebenprozesse gewonnen wird. Sie enthält demzufolge in der Hauptsache Kohlehydrate (Zucker und Dextrine), Stickstoffsubstanzen (Albumosen, Peptone und Aminosäuren) und endlich anorganische Salze, daneben natürlich noch viele andere, in geringerer Menge vorkommende Stoffe des Pflanzenorganismus.

Die Reaktion der Würze ist gegen Phenolphthalein sauer, wohl in der Hauptsache bedingt durch primäre Phosphate, daneben vielleicht noch organische Säuren und sauer reagierende Eiweißabbauprodukte. Bestimmt wurde bisher in der Würze fast allein die sogenannte Titrationsacidität, also die Summe der aktuellen und potentiellen Wasserstoffionen und vereinzelt auch die Wasserstoffionenkonzentration, also die aktuellen Wasserstoffionen allein.

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns auch zunächst auf die Titrationsacidität, und zwar in der Lüersschen Versuchsanordnung, beschränkt, werden aber die gefundenen Resultate späterhin durch Messungen der Wasserstoffionenkonzentration ergänzen.

Es sei zunächst auf die Methode der Aciditätbestimmung nach Lüers etwas näher eingegangen.

Wenn man zu einer Lösung von primärem Alkaliphosphat allmählich Natronlauge zugibt, so tritt bekanntlich bei Anwendung von Phenolphthalein als Indicator der erste rote Farbton auf, wenn noch nicht alles primäre Phosphat in sekundäres übergegangen ist, also in der Lösung ein Gemisch von primärem und sekundärem Salz in einem ganz bestimmten Verhältnis vorliegt, da die Wasserstoffionenkonzentration reinen sekundären Phosphats kleiner ist, als dem Umschlagspunkt des Phenolphthaleins entspricht. Man würde demnach, wenn man eine physiologische Flüssigkeit, die primäres Phosphat enthält, mit Natronlauge titriert, eine geringere Laugenmenge brauchen, als zur Überführung sämtlichen primären Phosphats in sekundäres notwendig ist, im Falle nur bis zum Auftreten des ersten roten Farbtons titriert wird. Ist schon der Begriff des ersten roten Farbtons für jeden

Digitized by Google

Beobachter ein individueller und damit nicht scharf definierter, so ist auch der Punkt als solcher nicht sehr geeignet zur Festlegung der Titrationsacidität von physiologischen Flüssigkeiten, da diese infolge der nicht vollkommenen Austitrierung des primären Phosphats zu niedrig ausfällt.

Diese Nachteile vermeidet nun Lüers, indem er nicht bis zum ersten roten Farbton titriert, sondern einen dunkleren wählt, der genau festgelegt ist und die Gewähr gibt, daß sämtliches in der Lösung vorhandenes primäre Phosphat in sekundäres übergeführt ist.

Die Ausführung der Bestimmung geschieht in einem von Lüers konstruierten Acidimeter[1]), das in der Hauptsache aus

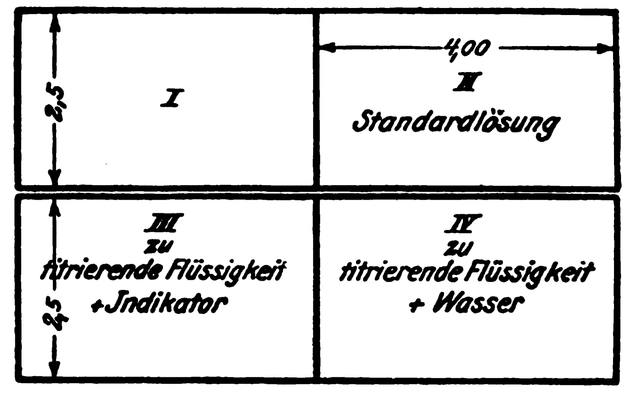


Abb. 1.

4 plangeschliffenen, gleich großen Glaströgen besteht, von denen, wie es die Abb. 1 zeigt, je 2 und 2 fest miteinander verbunden sind, die sich in einem Guckkasten befinden. Diese Versuchsanordnung gestattet nicht nur in farblosen, sondern auch in nicht zu dunkel gefärbten Flüssigkeiten sehr genau den nach obiger Definition festgelegten Titrationspunkt zu bestimmen. Die Handhabung des Apparates geschieht in der Weise, daß in den Trog II die rote, durch einen organischen Farbstoff von Lüers in obiger Weise definierte Standardlösung kommt, während in Trog III und IV je 25 oder 50 ccm der zu titrierenden Flüssigkeit gegeben werden. Sieht man jetzt durch den Apparat durch, so ist die

[1]) Lüers, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 1914, S. 137 und W. Windisch und W. Dietrich, Wochenschr. f. Brauerei 1918.

Digitized by Google

physiologische Flüssigkeit in Trog IV durch die vorgelegte Farblösung rötlich gefärbt, während die andere Seite ihre Eigenfarbe beibehält. Man setzt jetzt zu 50 ccm der physiologischen Flüssigkeit in Trog III 5 ccm Phenolphthaleinlösung nach Sörensen (0,5 g Phenolphthalein gelöst in 500 ccm Alkohol und 500 ccm Wasser) und, um die gleichen Verhältnisse zu schaffen wie in Trog III, 5 ccm Wasser dem Trog IV zu. Dann beginnt die eigentliche Titration, indem man so lange $^{n}/_{10}$-Lauge zu Trog III zusetzt, bis allmählich eine Rötung der Flüssigkeit beginnt. Man liest nun die verbrauchten Kubikzentimeter Lauge ab und gibt die gleiche Menge Kubikzentimeter Lauge zu Trog IV zu, um wieder Übereinstimmung mit Trog III zu erzielen (Zufärbung der Flüssigkeiten, Trübungen usw. durch die Natronlauge). Darauf titriert man nun in Trog III weiter, bis der Durchblick durch das Acidimeter auf der rechten und linken Seite ein gleiches Bild (gleiche Rotfärbung) zeigt. Die verbrauchten Kubikzentimeter geben dann die Gesamtacidität (Titrationsacidität) nach Lüers im oben definierten Sinne an.

Wir sind auf die Beschreibung dieser Methode näher eingegangen, da sie nicht nur für Würzen und Biere, sondern überhaupt für alle physiologischen Flüssigkeiten, wie z. B. Kaltwasserauszüge aus Pflanzenmehlen[1]), gute Dienste leistet. Des ferneren sind die Tröge auch ausgezeichnet zu vergleichenden Farbversuchen von physiologischen Flüssigkeiten zu verwenden.

Für die Versuche dieser Arbeit ist der Apparat von uns etwas abgeändert worden. Bei den Originalgrößenverhältnissen des Lüersschen Apparates, wie sie aus der Abb. 1 erkenntlich sind, sind Flüssigkeitsmengen unter 20 ccm nur schwierig zu titrieren. Bei Untersuchungen von Ultrafiltraten, wie sie in dieser Arbeit ausgeführt wurden, und bei Untersuchungen von Blutserum usw. stehen nun im allgemeinen Mengen von über 10 ccm kaum zur Verfügung, was einer zu titrierenden Flüssigkeitsmenge von 5 ccm entspricht, da ja in Trog III und IV gleiche Flüssigkeitsmengen kommen.

Zur Titration kleiner Mengen ließen wir den Doppeltrog III/IV in den Dimensionen der Abb. 2 herstellen und klebten dann den in der Zeichnung dick ausgezogenen Teil der Glaswand mit schwarzem Papier zu. Bei diesen Dimensionen des Acidi-

[1]) W. Windisch und W. Dietrich, Wochenschr. f. Brauerei 1918.

Digitized by Google

meters bleiben die ursprünglichen Maßverhältnisse (Schichtdicke der Farblösung und Titrationsflüssigkeiten) gewahrt, und trotz dem kann mit Mengen bis 2,5 ccm Titrationsflüssigkeit herab gearbeitet werden.

Sämtliche folgenden Versuche wurden mit einer hellen Vorderwürze durchgeführt, die vom Läuterbottich fortgenommen in kleine Flaschen (300 ccm bis 100 ccm) abgefüllt und dann durch dreimaliges Sterilisieren an aufeinanderfolgenden Tagen haltbar gemacht worden war. Die Würze zeigte 16,4% Bllg (Prozent Extraktgehalt) im Durchschnitt. Benutzt wurde sie nach mehrmonatigem Stehen. Für die Versuche wurde vorsichtig vom

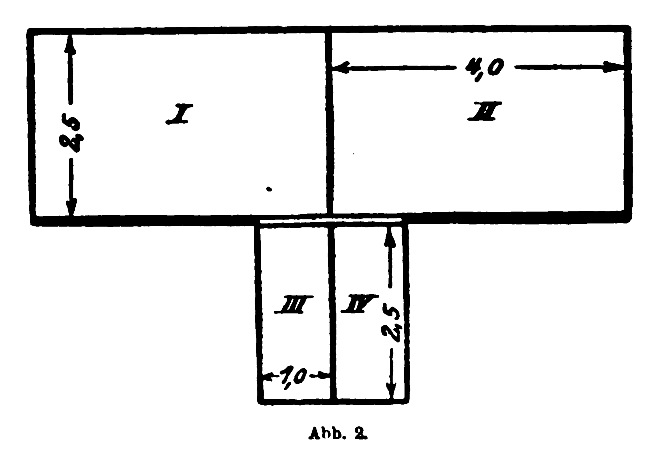


Abb. 2.

Bodensatz abgegossen und dann das abgefüllte Volumen auf das Doppelte verdünnt, so daß es sich bei den Versuchen um eine etwa 8,2 proz. Würze handelte. Das Bier aus dieser Würze wurde in der Weise gewonnen, daß Fläschchen der ursprünglichen Vorderwürze mit untergäriger Reinzuchthefe U_{I_3} des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin geimpft wurden und dann 4 Tage bei Zimmertemperatur gärten. Nach dem Abgießen von der Bodensatzhefe wurde wieder auf das Doppelte verdünnt.

Die folgenden Versuchsreihen behandeln zunächst die Veränderung der Titrationsacidität nach Lüers und der Oberflächenspannung von Würze und Bier durch fraktionierte Ultrafiltration mit Bechholdschen Eisessigkollodiumfilter von 1%, 3%, 4,5%, 6% und 7,5% Imprägnation. Ultrafiltriert wurden jedesmal 20 ccm der ursprünglichen Flüssigkeit im großen Bech-

Digitized by Google

holdschen Apparat ohne Rührung bis zur beendigten Filtration mit Drucken von 2—3 Atm. bei den niedrigstprozentigen Filtern und von 8—10 Atm. bei den hochprozentigen.

Titriert wurden nach Lüers stets 5 ccm, wobei die $^{n}/_{10}$-Lauge aus einer in Hundertstel Kubikzentimeter geteilten Bürette zugelassen wurde.

1. Acidität nach Lüers.

5 ccm Würze (Bllg° 8,4).

Ultrafilter %	0	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
ccm $^{n}/_{10}$-Lauge:	0,53	0,52	0,46	0 43	0,44	0 41

2. Acidität nach Lüers.

5 ccm Bier (Bllg° 2,0).

Ultrafilter %	0	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
ccm $^{n}/_{10}$-Lauge:	0,74	0,66	0,60	0,54	0,54	0,50

Eine Probe des Bieres (150 ccm) wurde 20 Minuten am Rückflußkühler gekocht, um festzustellen, inwieweit die beim Bier eingetretene Aciditätsteigerung gegenüber der Würze auf Anwesenheit von Kohlensäure zurückzuführen sei. Nach dem Abkühlen wurde von dem ausgeschiedenen koagulierten Eiweiß durch ein gewöhnliches Faltenfilter abfiltriert und dann wie bei den vorigen Versuchsreihen verfahren.

3. Acidität nach Lüers.

5 ccm gekochtes Bier (Bllg° 2,0).

Ultrafilter %	0	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
ccm $^{n}/_{10}$-Lauge:	0,65	0,56	0,53	0,48	0,49	0,45

Betrachtet man die aus den Tabellen sich ergebenden Resultate, so macht sich, wenn man zunächst von der fraktionierten Ultrafiltration absieht und nur die Zahlen unter Null betrachtet, eine bedeutende Aciditätssteigerung von der Würze zum Bier bemerkbar, die nur zu einem Teil auf Kohlensäure, zum anderen Teil aber, wie Tabelle 3 zeigt, auf kochbeständige, nichtflüchtige, bei der Gärung gebildete saure Stoffe zurückzuführen ist, eine Tatsache, die lange bekannt ist.

Was die Resultate der fraktionierten Ultrafiltration anbetrifft, so zeigt Tabelle 1, daß die Acidität zu rund 25% der Gesamtmenge fraktioniert abfiltriert wird, also entweder durch Stoffe bedingt ist, die als solche auf dem Ultrafilter zurückgehalten werden, weil sie aus Teilchen kolloidaler Größenordnung bestehen,

Digitized by Google

oder die mechanisch nach dem Gibbsschen Theorem adsorbiert werden, trotzdem ihre Teilchengröße im molekular-dispersen Gebiet liegt.

Tabelle 2 und 3 zeigen dieselbe Erscheinung der fraktionierten Ultrafiltration der Acidität bei Bier und gekochtem· Bier. Die Aciditätserhöhung gegenüber Würze bleibt auch hier, selbst bei dem engsten Ultrafilter, erhalten.

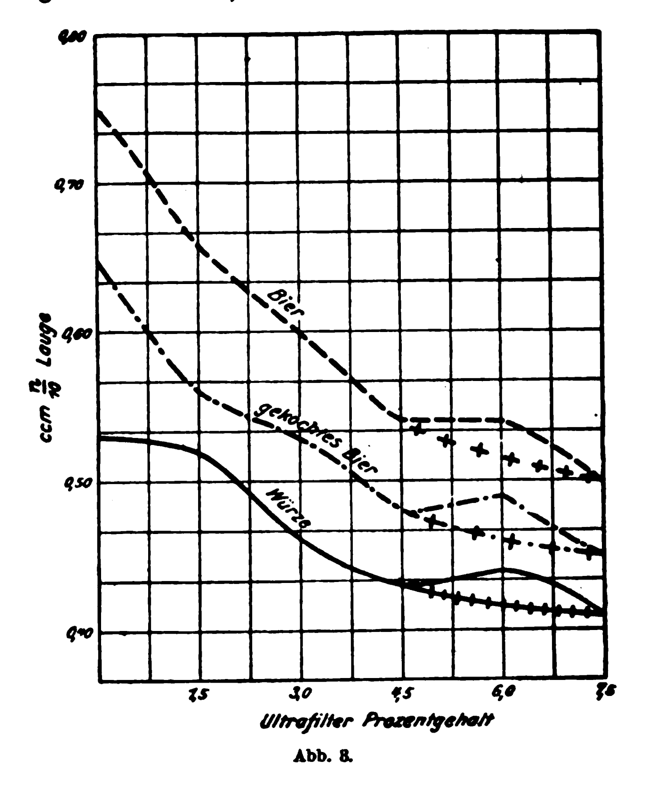


Abb. 3.

Die Versuchsergebnisse werden deutlicher, wenn man die Kurven der Abb. 3 betrachtet, die die Zahlen der drei obigen Tabellen veranschaulicht.

Die Gesamtheit der Kurven zeigt die deutlich fallende Aciditätsskala Bier ⟶ gekochtes Bier ⟶ Würze.

Betrachtet man zunächst die Würzekurve, so sieht man, daß der Aciditätsabfall zwischen 0 und 1,5 sehr gering ist, dann stark zwischen 1,5 und 4,5 stattfindet, von 4,5—6,0 etwas ansteigt und dann wieder fällt. Sehen wir zunächst einmal von dem

Digitized by Google

Aciditätsanstieg von 4,5—6,0 ab und nehmen die direkte Verbindungslinie (—+—+—+—) zwischen 4,5 und 7,5 als Kurvenverlauf an, indem wir voraussetzen, daß die Ultrafiltration mit 6 proz. Filter ausgelassen worden ist, so würde die Kurve aussagen, daß die Hauptmenge der durch Ultrafilter zurückhaltbaren Acidität schon durch ein 3- bzw. 4,5 proz. Filter zurückgehalten wird und ein geringerer Teil dann noch durch das 7,5 proz. Ziemlich stark saure Eigenschaften würden also Teilchen der Größenordnung 3 und 4,5 zeigen.

Es ist nun interessant, daß die Veränderung der Farbe der Würze ungefähr analog mit dieser Kurve verläuft. Durch 1,5 proz. Filter tritt in der Hauptsache eine Klärung und nur eine ganz geringe Farbenaufhellung ein. Durch 3 proz. Filter wird die Aufhellung stark (hellgelb), durch 4,5 proz. Filter tritt noch ein geringes Hellerwerden ein, durch 6 proz. Filter läuft die Würze dunkler als durch 4,5 proz. Filter, und am hellsten ist sie endlich nach der Filtration durch ein 7,5 proz. Filter. Die Hauptmenge der eigentlichen Würzefarbstoffe wird also durch ein 3- bzw. 4,5 proz. Filter abfiltriert. Die Farbe, die bis zum Schluß erhalten bleibt, ist dasselbe Gelb, das man bei Kaltwasserauszügen aus Gerstenmehlen sieht. Dieser krystalline Farbstoff wird also von der Gerste bis zum fertigen Biere mitgenommen, zeitweise verdeckt durch kolloidale, wahrscheinlich beim Darren aus Zucker und Eiweißstoffen gebildete Farbstoffe.

Die vergorene Würze (Bier) zeigt einen ganz ähnlichen Verlauf der Aciditätskurve wie die Würze, nur daß dieselbe, der vermehrten Acidität entsprechend, entfernter von der Abszissenachse verläuft. Ganz natürlich erklärt sich die Erscheinung, daß der Kurvenabfall zwischen Nullpunkt und 1,5 verhältnismäßig viel stärker ist als bei der Würze, aus der Tatsache, daß die freie Kohlensäure durch das 1,5 proz. Ultrafilter aus dem Bier herausgepreßt wird. Im übrigen verläuft sie fast parallel der Würzekurve. An der schon oben erwähnten Stelle zeigt auch sie wieder einen geknickten Verlauf.

Zwischen diesen beiden Kurven verläuft nun die des gekochten Bieres. Ihr Verlauf ist analog der des ungekochten Bieres, nur weniger weit von der Abszisse entfernt. Auffällig ist hier der zwischen Nullpunkt und 1,5 ebenso steile Verlauf wie bei der obersten Kurve, die hier nicht mehr mit Entfernung der freien

Digitized by Google

Kohlensäure zu erklären ist, da diese schon durch das Kochen entfernt ist. Es muß sich hier um die Entfernung von durch das Kochen stark vergröberten sauren Teilchen handeln. Es sieht so aus, als ob saure Teilchen der Größenordnung 3,0—4,5 zur Größenordnung 1,5 hin verschoben worden sind, da sich in dem Teil 1,5—4,5 die Kurve hebt. Der starke Aciditätsabfall ist also durch das Kochen in ein gröber disperses Gebiet verschoben worden.

Den in Würze und Bier nach der schärfsten Ultrafiltration verbleibenden Hauptteil der Acidität müssen wir wohl in der Hauptsache auf primäre Phosphate bzw. organische Säuren, also molekular-disperse Systeme, zurückführen.

Die Abnahme der Farbenintensität der beiden Biere verlief bei der Ultrafiltration ganz analog der Würze.

Bevor wir auf eine Besprechung der möglichen Ursachen des geknickten Verlaufes der Kurven eingehen, wollen wir, da hier eine Wiederholung dieses Falles eintritt, erst die Veränderung der Oberflächenspannungsverhältnisse besprechen.

1a. Oberflächenspannung.
5 ccm Würze.

Ultrafilter %	0	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
Oberflächenspannung:	76,0	78,0	88,0	96,5	94,5	107,0

2a. Oberflächenspannung.
5 ccm Bier.

Ultrafilter %	0	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
Oberflächenspannung:	76,0	78,0	87,5	94,5	94.0	99,0

3a. Oberflächenspannung.
5 ccm gekochtes Bier.

Ultrafilter %	0	1.5	3,0	4,5	6,0	7,5
Oberflächenspannung:	75.5	80 5	87,0	89,0	90,0	99,0

Betrachtet man die Oberflächenspannungswerte der Spalten 0 der drei Versuchsreihen, also der unfiltrierten Würzen und Biere, so sieht man, daß die Oberflächenspannungsdepression von Würzen und Bieren gegenüber dem Wasserwert beträchtlich ist. Auffällig ist, daß das Bier denselben Wert zeigt wie die Würze, trotzdem doch bei der Gärung durchgreifende chemische Veränderungen vor sich gehen.

Digitized by Google

Die Oberflächenaktivität der Würze muß hauptsächlich den Eiweißkörpern und ihren Abbauprodukten zugeschrieben werden, denn es besteht bekanntlich die fallende Stufenleiter Albumosen ——→ Peptone ——→ Aminosäuren der Oberflächenaktivität. Die Zucker und Dextrine sind capillarinaktiv. Bei dem Bier kommen zu den capillaraktiven Körpern der Würze neue oberflächenaktive Körper hinzu, der Alkohol (Äthylalkohol) bzw. höhere Alkohole (Amylalkohol usw.) und Ester; zu gleicher Zeit gehen aber sicher durch Vermehrung der Hefensubstanz, also auch des Hefeneiweißes, oberflächenaktive Stickstoffkörper verloren und des ferneren auch durch Koagulationsvorgänge bei der Gärung. Interessant ist nur, daß sich diese ganzen Vorgänge, die entgegengesetzt sind, zum Schluß in ihrer Wirksamkeit auf die Oberflachenaktivität ausgleichen. Wir haben diese Tatsache nicht nur in dem oben angeführten Fall beobachten können, sondern auch bei vielen zu anderen Zwecken angestellten Gärversuchen.

Durch fraktionierte Ultrafiltration nähert sich die Oberflächenspannung der Würze mehr und mehr dem Wasserwert. Das gleiche gilt für Bier und gekochtes Bier, nur daß die Inaktivierung hier nicht so weit geht wie bei der Würze. Das würde also heißen, bei der Würze ist die Oberflächenaktivität so gut wie ausschließlich auf Körper kolloidaler Größenordnung zurückzuführen, die vom Ultrafilter zurückgehalten werden; bei dem Bier dagegen beteiligen sich auch in weitgehenderem Maße molekular-disperse, nicht ultrafiltrierbare Stoffe. Es stimmt das mit den obigen Überlegungen überein, daß im Bier teilweise die Alkohole usw., die molekular-dispers sind, an Stelle der kolloidalen oberflächenaktiven Stickstoffkörper getreten sind.

Die Tabellen sind nun auch wieder als Kurven auf Abb. 4 eingetragen. Sie bestätigen das eben Gesagte. Betrachtet man die Kurven der Würze und des ungekochten Bieres, die bis auf den letzten Teil annähernd zusammenlaufen, so sieht man, daß von 0—1,5 nur ein geringes Ansteigen der Oberflächenspannung erfolgt, von 1,5—4,5 ein intensiveres Steigen einsetzt, das sich, wenn wir zunächst den Knick in der Kurve wieder nicht berücksichtigen, intensiv bis 7,5 fortsetzt. Von 4,5 ab erfolgt die deutliche Trennung der Würze- und Bierkurve durch den gebildeten Alkohol.

Digitized by Google

Was sagen diese beiden Kurven über die Beteiligung der einzelnen Größenordnungen der oberflächenaktiven Stoffe, wie sie durch das Ultrafilter differenziert werden, an der Oberflächenaktivität der Würze aus? Zu diesem Zweck muß man sich noch einmal vorstellen, daß bei einer oberflächeninaktiven Lösung der Zusatz der ersten Mengen einer oberflächenaktiven Substanz am stärksten spannungserniedrigend wirkt und dann für gleiche Mengen capillaraktiver Substanz die Depressionsdifferenz immer kleiner wird. Betrachten wir unter diesem Gesichtswinkel die Kurve der Würze, so können wir sagen, daß die kleinsten Stickstoffteilchen

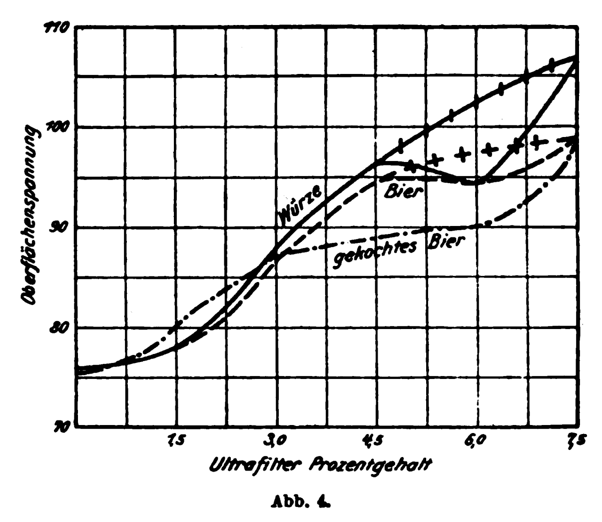


Abb. 4.

relativ am wenigsten an der Oberflächenaktivität beteiligt sind, trotzdem ja in dieser Region die Kurve am steilsten ist, die Teilchen mittlerer Größenordnung stärker und die größten am allerstärksten, im Gegensatz zur Steilheit des Kurvenverlaufes. Ob es sich dabei um verstärkte Oberflächenaktivität der größeren Teilchen als solche handelt oder um eine Vermehrung der Teilchen zahl, bleibe dahingestellt; wahrscheinlich fällt beides zusammen, denn in der Tat wissen wir ja, daß von den Aminosäuren über die Peptone zu den Albumosen die Oberflächenaktivität zunimmt und in derselben Reihenfolge auch eine Vergrößerung der Teilchen anzunehmen ist.

Der Beweis für die aufgestellte Behauptung liegt in folgendem: Die Würzekurve verläuft, wenn man mit der Betrachtung

Digitized by Google

oben rechts der Zeichnung beginnt, im ganzen ersten Teil konvex und erst zuletzt konkav. Aus früheren Arbeiten wissen wir nun, daß eine normale Oberflächenspannungskurve, wie man sie erhält, wenn man zu Wasser immer gleiche Mengen capillaraktiver Substanz fortlaufend zusetzt, im ganzen Verlauf konkav ist, wie die Abb. 5 zeigt, wo die Kurve (--------) eine derartige normale Oberflächenspannungskurve darstellt, während die ausgezogene (———) die Würzekurve ist, nur daß beide in umgekehrter Richtung wie in Abb. 4 eingetragen sind. Die beiden Kurven klaffen anfangs weit auseinander und nähern sich zum Schluß. Das be-

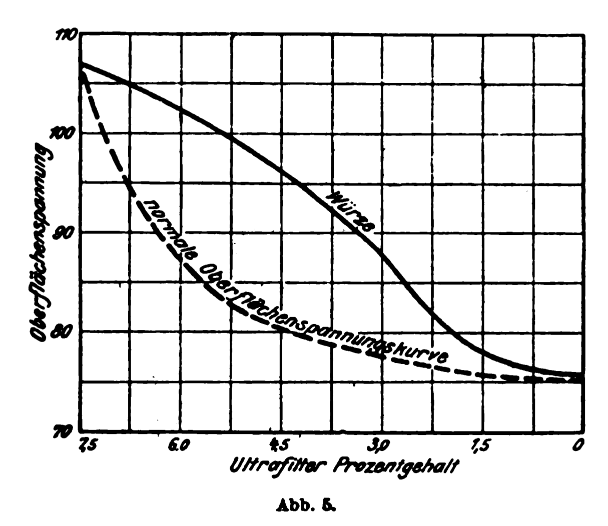


Abb. 5.

weist die oben aufgestellte Behauptung. Es sind also wahrscheinlich Aminosäuren am wenigsten, Peptone stärker und Albumosen am stärksten n der Oberflächenaktivität beteiligt.

Das gekochte Bier zeigt nun, gegenüber dem ungekochten, einen stark veränderten Verlauf der Oberflächenspannungskurve. Es beruht das auf den durchgreifenden Veränderungen, die durch das Kochen unter den Eiweißkörpern sich abspielen. —

Interessant ist nun, daß sich der Knick in den Kurven, wie wir ihn bei 6,0 bei den Aciditätskurven durchweg feststellen konnten, sich bei den Oberflächenspannungskurven wiederholt, so daß sich damit erneut die Tatsache ergibt, daß ein 4,5 proz. weiterporiges Filter mehr Kolloide zurückhält als ein engerporiges 6 proz. Die Erklärung liegt vielleicht in folgendem:

Digitized by Google

Wie man weiß, nimmt die Porengröße der Ultrafilter von 1,5—7.5% Imprägnation immer mehr ab. Wie wird sich ein Teilchen verhalten, das etwas größer ist als die Filterpore, durch die es hindurchgehen soll? Angenommen, es handelt sich um ein festes, kugelförmiges Teilchen, dessen Formelastizität sehr groß ist, so wird sich dieses auf das Filter wie auf ein Sieb legen und trotz des auf ihm lastenden Filtrationsdruckes keine merkliche Formveränderung erleiden. Es wird die Filterpore wie ein aufgelegter Deckel verschließen. Angenommen, das Teilchen verliere an Formelastizität, d. h. es gibt einer es deformierenden Kraft leichter nach als das ursprüngliche Teilchen, so wird der Filtrationsdruck eine Deformation ausüben und es dabei in die Filterpore etwas hineinquetschen. Das Teilche wird dann sozusagen wie ein Pfropfen in der Filterpore sitzen. Angenommen, die Formelastizität ginge mehr und mehr verloren, so nähert das Teilchen sich mehr und mehr dem flüssigen Zustand, und allmählich wird der Filtrationsdruck dasselbe durch die Filterpore hindurchpressen. Stellen wir uns das Teilchen in kolloidalen Dimensionen vor, so sehen wir in den besprochenen Zustandsänderungen den allmählichen Übergang eines Suspensoids in ein Emulsoid. Ein Teilchen, das größer ist als die Pore des betreffenden Ultrafilters, wird also hindurchgepreßt werden, wenn der deformierende Druck größer ist als die Formelastizität.

In einer Würze werden wir nun Teilchen von ganz verschiedener Größe und Formelastizität haben, und zwar kann man wohl annehmen, daß die hochmolekularen Eiweißabbauprodukte, wie die Albumosen, sowohl ein größeres Molekül als auch eine größere Formelastizität haben und daß diese beiden Eigenschaften mit weiterem Abbau über die Peptone zu den Aminosäuren abnehmen. Es würde also große Teilchengröße mit großer Formelastizität und kleine Teilchengröße mit kleiner Formelastizität zusammenfallen. Mittlere Teilchengröße und noch deutliche Formelastizität fände sich also bei den Eiweißabbauprodukten von mittlerer Größenordnung, wie den Peptonen.

Diese Überlegungen erklären nun den geknickten Verlauf der Aciditäts- und Oberflächenspannungskurven. Die Poren der weitesten Filter (1,5 und 3%) werden, da hier Teilchen von relativ hoher Formelastizität, die nicht pfropfenartig in die Poren hineingetrieben werden können, abfiltriert werden, nicht so verklebt

Digitized by Google

wie die Poren der Filtergröße 4,5, wo Teilchen mittlerer Formelastizität und mittlerer Größe, die den Partikeln der Größenordnung 1,5 und 3,0% zugemischt werden, pfropfenartig die Poren verschließen können. Es würde demnach nur eine ganz kurze Zeit die wahre Porengröße filtrierend wirken und dann das Filter nach eingetretener Verklebung als ein viel engeres Filter wirken, als es seiner Imprägnation nach ist. Bei einem etwas engeren Filter, also 6proz. Imprägnation, liegen die Verhältnisse wieder günstiger, da infolge Vergrößerung der Unterstützungsfläche der mit obigen Eigenschaften ausgestatteten Teilchen der Porengröße 4,5, infolge Verengerung des Porendurchmessers die Teilchen nicht so fest in die Löcher hineingepreßt werden können. Sie wirken daher mehr deckelartig, wie die größeren Teilchen im Falle der Filter 1,5% und 3,0%, worauf oben hingewiesen worden ist, während die Teilchen der Größenordnung 6% infolge ihrer schon stark verminderten Formelastizität durch diese Porenweite bei dem angewendeten Druck noch hindurchgequetscht werden. Beim Filter 7,5% ist nun die Porengröße so gering geworden, daß der Druck nicht mehr ausreicht, die Teilchen von geringer Formelastizität, die durch 6proz. Filter noch hindurchgepreßt werden, hindurchzudrücken, so daß hier wieder eine Vermehrung der herausfiltrierten Kolloide eintritt.

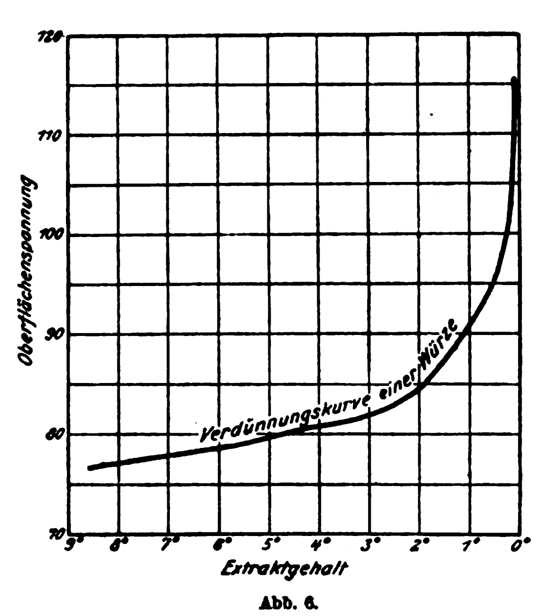


Abb. 6.

In der folgenden Versuchsreihe haben wir festgestellt, einer welchen Verdünnung einer normalen Würze mit der Oberflächenspannung 76,5 und dem Extraktgehalt 8,6° Bllg, die durch schärfste Ultrafiltration erreichte Entspannung von 107,0 entspricht,

Digitized by Google

indem die betreffende Würze immer wieder um das Doppelte verdünnt wurde.

Entspannung von Würze durch Verdünnung.

Bllg° Extraktgehalt	8,6	4,3	2,15	1,07	0,54	0,27	0,13	0,07
Oberflächenspannung	76,5	80,5	83,5	90,5	95,0	99,5	103,0	115,5

Diese Tabelle ist als Kurve in Abb. 6 eingetragen. Die Kurve zeigt den normalen Verlauf einer Oberflächenspannungskurve, wie wir sie in einem der vorigen Absätze als normal definiert hatten. Durch die Ultrafiltration wird somit so viel an capillaraktiver Substanz aus obigen ultrafiltrierten Würzen entfernt, wie in einer 0,1 proz. Würze normal vorhanden ist, denn eine 0,1 proz. Würze und eine ultrafiltrierte 8,4 proz. Würze zeigen annähernd denselben Oberflächenspannungswert.

Zusammenfassung.

1. Durch Ultrafiltration von Würze, Bier und gekochtem Bier durch ein Bechholdsches Filter von 7,5% Imprägnation wird ein Teil der Titrationsacidität entfernt, und zwar aus der Würze rund 25%, dem Bier 35% und dem gekochten Bier 30% der Gesamtacidität.

2. Durch fraktionierte Ultrafiltration wird die Würze und das Bier allmählich weitgehend entspannt, und man kann annehmen, daß die kleinsten ultrafiltrierbaren Teilchen relativ am wenigsten, die mittleren stärker und die größten am stärksten an der Gesamtoberflächenspannung der Flüssigkeiten beteiligt sind.

3. Durch Vergärung der Würze wird trotz Neubildung capillaraktiver Substanzen, wie Alkohole, Ester usw., und trotz der Entfernung capillaraktiver Substanzen durch die Assimilation von Stickstoffkörpern durch die Hefe und durch Koagulationsvorgänge die Oberflächenspannung bei der Gärung nicht merklich geändert.

4. Die Würze- und Bierfarbstoffe sind von der Größenordnung, daß sie fast quantitativ durch ein 3 proz. bzw. 4,5 proz. Filter zurückgehalten werden. Die Ultrafiltrate von 4,5% ab haben die Farbe von Wasserauszügen aus Gerstenmehl.

5. Sowohl bei Würze wie Bier halten gröberporige 4,5 proz. Ultrafilter mehr kolloidale oberflächenaktive Teilchen zurück und entfernen auch mehr Acidität als engerporige 6 proz. Filter. Es wurde eine Erklärung für diese Erscheinung auf Grund physikalisch-chemischer Eigenschaften der abfiltrierbaren Stoffe zu geben versucht.


Digitized by Google

Zur Einwirkung von Diazomethan auf Aminosäuren.

Von

J. Herzig und Karl Landsteiner.

(Eingegangen am 11. Februar 1920.)

Im Zuge des einschlägigen Studiums der Eiweißstoffe haben wir[1]) im März 1914 Versuche des Herrn Schuster zur Methylierung von Aminosäuren mittels Diazomethan angekündigt und einige Resultate bereits mitgeteilt. Bald nachher (Juni 1914) haben Geake und Nierenstein[2]) eine Untersuchung der Einwirkung von Diazomethan auf Aminosäuren veröffentlicht. Sie fanden, daß die Säuren zum größten Teil unverändert und ungelöst zurückbleiben. Der kleinere, oft wenige Prozente betragende, veränderte lösliche Teil soll nach ihren Erfahrungen weder der Aminosäuremethylester noch ein am Stickstoff methyliertes Produkt sein. In diesem Verhalten erblicken sie einen direkten Beweis für die oft diskutierte Betainformel I der Aminosäuren

$$\text{I} \quad R\cdot CH \begin{matrix} \diagup CO \diagdown \\ \\ \diagdown NH_3 \diagup \end{matrix} O$$

Herr Schuster hat vom Beginn an sich auf die Aufklärung des in Reaktion getretenen Anteils beschränkt. Er hat nach seiner Rückkehr aus dem Felde seine Versuche ergänzt und beendigt. Seine Beobachtungen gehen dahin daß die Annahme von Geake und Nierenstein, wonach der lösliche Teil weder Methoxyl- noch Methylimidreste enthalten sollte, in dieser allgemeinen Fassung nicht zutreffend ist.

Glykokoll. Bei der Einwirkung von Diazomethan blieb die Hauptmenge ungelöst. Die Methoxylzahl des löslichen Teiles war fast Null, während die Methylimidbestimmung ein sehr kleines Plus gegen die Zahl, welche Glykokoll selbst liefert, ergab.

---

[1]) Diese Zeitschr. 61, 463. 1914.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 92, 149. 1914.

Digitized by Google

Glykokoll selbst 1,58% CH_3 an N geb. Mit CH_2N_2 behandelt 3,20% CH_3 an N geb.

Geake und Nierenstein fanden 94% unverändertes Glykokoll.

Hippursäure. Das Verhalten des Glykokolls hat die Untersuchung der Hippursäure nahegelegt. Der Einfluß der Benzoylgruppe erwies sich in der Tat als sehr bedeutend. Es entsteht, wie schon seinerzeit[1]) mitgeteilt, der Hauptmenge nach der Hippursäuremethylester.

Die Hippursäure besaß den richtigen Schmelzpunkt und die Methoxylbestimmung ergab ein rein negatives Resultat. Mit Diazomethan trat eine ziemlich glatte Reaktion ein. Nach dem Abdestillieren des überschüssigen Diazomethans hinterblieb eine kristallinische Verbindung vom Schmelzpunkt 73—75° (Hippursäuremethylester 80,5°). Die rohe nicht gereinigte Substanz ergab (im Vakuum bis zur Konstanz getr.) folgende analytische Daten:

$H_5C_6 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOCH_3$ Ber. OCH_3 16,06
Gef. OCH_3 17,66

Die Zahl für CH_3 an N geb. war nahezu dieselbe wie bei der Hippursäure selbst.

Durch eine weitere Behandlung mit Diazomethan hat sich keine wesentliche Veränderung dieser Werte ergeben.

Alanin. Der größte Teil der Substanz blieb nach der Einwirkung von Diazomethan ungelöst. Der lösliche Teil lieferte ein Öl, welches im Vakuum bis zur Konstanz gebracht werden konnte.

Bei der Analyse wurde der Gehalt an OCH_3 zu 3,79% gefunden, während die Methylimidbestimmung verunglückte. Für die Erkenntnis des Ganges der Reaktion ist die Methoxylzahl allein genügend, und es ist daher die Analyse nicht wiederholt worden.

Geake und Nierenstein haben 80% unverwendetes Alanin beobachtet.

Phenylalanin. Die Wirkung der Phenylgruppe auf die Reaktionsfähigkeit ist hier ebenso deutlich wie die des Benzoylrestes in der Hippursäure.

Das bei der Einwirkung von Diazomethan entstehende Öl gab bei der Analyse (vakuumtrocken) folgende Daten:

$H_5C_6 \cdot CH_2 \cdot CH\langle{NH \cdot CH_3 \atop COOCH_3}$ Ber. OCH_3 16,06 CH_3 an CH_3 geb. 7,77
Gef. OCH_3 15,18 CH_3 an CH_3 geb. 4,28

[1]) l. c.

Digitized by Google

Leucin. Bei der Einwirkung ist das Bild rein äußerlich wie beim Glykokoll. In der Tat fanden Geake und Nierenstein in Äthersuspension 65%, in Aceton 90% des unveränderten Leucins.

Das Resultat ist wesentlich anders, wenn man die Analyse des in Lösung gegangenen Teiles des Reaktionsproduktes berücksichtigt. Die Zahlen waren beim vakuumtrockenen Stoff folgende:

$$\begin{matrix} H_3C \\ H_3C \end{matrix}\!\!>CH \cdot CH_2CH<\!\!\begin{matrix} NHCH_3 \\ COOCH_3 \end{matrix}$$

Ber. OCH_3 23,64 CH_3 an N geb. 10,3
Gef. OCH_3 24,74 CH_3 an N geb. 5,84

Glutaminsäure. Von den bisher untersuchten Aminosäuren nimmt die Glutaminsäure eine Ausnahmestellung ein. Sie ging im Verlaufe der Einwirkung vollkommen in Lösung, und selbst nach zweitägigem Stehen ist noch immer etwas überschüssiges Diazomethan nachweisbar. Trotz des Überschusses und trotz der vollkommenen Lösung ist die Reaktion nicht zu Ende gegangen.

Die Analyse der vakuumtrockenen Substanz lieferte folgende Zahlen:

	Berechnet für		
	sauren Ester	neutralen Ester	Gefunden
OCH_3	19,24	35,43	25,05

Die Verhältnisse liegen also ähnlich wie bei der Einwirkung von 1—3 proz. methylalkoholischer Salzsäure auf Glutaminsäure, wobei auch ja hauptsächlich der saure Ester entsteht. Die gefundenen Werte für das CH_3 an N gebunden sind nahezu die gleichen, wie bei der Glutaminsäure selbst.

Tyrosin. Der Verlauf der Reaktion war der Art, daß ein Teil des Tyrosins ungelöst blieb, während der gelöste Teil nach dem Abdestillieren des überschüssigen Äthers als Öl vorhanden war, welches bis zur Konstanz getrocknet und analysiert werden konnte.

Die analytischen Daten sind folgende:

$$H_3CO \cdot H_4C_6 \cdot CH_2 \cdot CH<\!\!\begin{matrix} NH \cdot CH_3 \\ COOCH_3 \end{matrix}$$

Ber. OCH_3 27,8 CH_3 an N geb. 6,73
Gef. OCH_3 27,4 CH_3 an N geb. 5,44

Neuerdings mit Diazomethan behandelt lieferte das Öl vakuumtrocken folgende Werte:

27,98% OCH_3 und 5,73% CH_3 an N geb.

Bei der Untersuchung eines Tyrosins von anderer Provenienz wurden ganz ähnliche Resultate erhalten.

Digitized by Google

Das Öl scheint unzersetzt destillierbar zu sein, doch konnte wegen Materialmangels eine Reinigung durch Destillation nicht unternommen werden.

Die beschriebenen Reaktionsprodukte der Aminosäuren stellen meist Öle dar, welche nur schwer gereinigt werden konnten. Halogenhydrate, Pikrate usw., sind bis jetzt, vielleicht wegen der geringen zur Verfügung stehenden Menge, in brauchbarer Form nicht erhalten worden.

Zusammenfassend kann man über das Resultat dieser Versuche folgendes aussagen:

Nahezu vollkommen nicht substituierbar sind nur die beiden niedersten Aminosäuren, Glykokoll und Alanin, bei beiden zeigt sich aber deutlich die Einwirkung des Eintrittes einer negativen Gruppe auf die Reaktionsfähigkeit gegen Diazomethan.

Bei den anderen untersuchten Aminosäuren sind die Substitutionen in der Carboxylgruppe und am Stickstoff auseinanderzuhalten. Die Carboxylgruppen reagieren zumeist fast vollständig, während die Substitution am Stickstoff nur sehr träge verläuft. Das Vorhandensein als freie Aminosäure ist allerdings schon durch die Reaktionsfähigkeit der Carboxylgruppe wahrscheinlich gemacht, während der Eintritt des Methylrestes am Stickstoff aus anderen noch unbekannten Gründen verhindert werden kann.

Will man die Reaktionslosigkeit gegen Diazomethan in ätherischer Suspension mit Geake und Nierenstein als Beweis für die betainartige Struktur einer Aminosäure gelten lassen, so könnte man dieselbe nur dem Glykokoll und vielleicht noch dem Alanin zuschreiben, während bei allen anderen bisher untersuchten Aminosäuren ein Gleichgewicht zwischen der betainartigen und der gewöhnlichen Formulierung angenommen werden müßte.

Daß die Ursache der Widerstandsfähigkeit der Aminosäuren gegen Diazomethan tatsächlich in der betainartigen Bindungsweise derselben liegt, scheint allerdings aus dem Verhalten der Glutaminsäure hervorzugehen, da eine Carboxylgruppe voll und glatt reagiert und die Schwierigkeiten sich erst bei der Ätherifizierung der zweiten Gruppe ergeben.

[1]) Monatshefte f. Chemie 39, 278. 1918.

Digitized by Google

Erwiderung an Herrn Wolfgang Heubner[1]).

Von

J. Traube.

(Aus der Technischen Hochschule zu Charlottenburg.)

(Eingegangen am 12. Februar 1920.)

Damit nicht Schweigen als Zustimmung gedeutet wird, sehe ich mich zu folgender kurzen Erwiderung der Bemerkungen des Herrn Heubner zu meiner Abhandlung über die physikalische Theorie der Arzneimittel- und Giftwirkung[2]) veranlaßt.

Wie man in den Theorien der Färbungsvorgänge von jeher physikalische und chemische Anschauungen einander gegenüberstellte, so ist dies auch in der Pharmakologie angängig, und es ist hier um so mehr erwünscht, einmal mit Nachdruck den physikalischen Standpunkt hervorzuheben, als auf diesem Gebiete bisher im großen und ganzen chemische Gesichtspunkte nahezu allein ausschlaggebend gewesen sind.

Wie in den Theorien der Färbung nach Entwicklung insbesondere der Kolloidlehre die Vertreter der chemischen Theorien immer mehr in die Enge getrieben wurden und die rein chemischen Betrachtungen über die Färbungsvorgänge immer mehr zurücktraten und physikalischen Betrachtungen über Quellung, Dispersitätsänderung, Flockung Adsorption usw. weichen mußten, so wird dies auch in der Pharmakologie der Fall sein, und Herr Heubner sowie sonstige allzu chemisch empfindende Pharmakologen werden es sich gefallen lassen müssen, daß man für etliche Arzneimittelklassen, ganz besonders für die „homöopathisch" wirkenden Arzneimittel (Alkaloide, Desinfizienzien, Narkotica, Excitanzien usw.), anstatt der chemischen Wirkungen in erster Linie physikalische Wirkungen (wie Quellung, Flockung, Adsorption, katalytische Wirkung usw.) zugrunde legt. Es sei daran erinnert, daß bereits auf einem mit der Pharmakologie im engsten Zusammenhang stehenden Gebiete, der Immunitätslehre, der Lehre von den Toxinen und Antitoxinen, die chemischen Theorien Ehrlichs den neuen kolloidphysikalischen Anschauungen haben weichen müssen, und der Verfasser dieser Mitteilung darf darauf hinweisen, daß zu einer Zeit, als Ehrlichs Ansichten in Deutschland noch nahezu allgemein das Feld behaupteten, er nachdrücklich auf die Unhaltbarkeit der Seitenkettentheorie[3]) hingewiesen hat.

Herr Heubner meint, daß man die Begriffe „chemisch" und „physikalisch" nicht scharf fassen könne. Das ist ohne weiteres zuzugeben. Es wurde von mir mit aller Deutlichkeit darauf hingewiesen, daß in letzter

[1]) Heubner, diese Zeitschr. **101**, 54. 1919.

[2]) Traube, diese Zeitschr. **98**, 177. 1919.

[3]) Traube, Über die Resonanztheorie, eine physikalische Theorie der Immunitätserscheinungen. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. **9**, 246. 1912.

Digitized by Google

Linie die physikalischen Kräfte der Oberflächenspannung und Kohäsion auf dieselbe Ursache zurückzuführen sind wie die chemischen Kräfte[1]). Und doch weiß jeder oder sollte ein jeder wissen, was bei dem heutigen Stande der Wissenschaft unter physikalischen und chemischen Kräften verstanden wird. Die chemischen Affinitätswirkungen erfolgen nach festen Proportionen, während auf dem Gebiete der physikalischen Wirkungen (Quellung, Flockung, Adsorption usw.) die Fundamentalgesetze der Chemie ungültig sind.

Diese allgemeinen Bemerkungen mögen genügen. Was die speziellen Bemerkungen Herrn Heubners betrifft hinsichtlich meiner Ausführungen zu den Arbeiten von Ishizaka und Schwalb, so sehe ich mich nicht veranlaßt, in irgendeiner Richtung meinen Standpunkt zu ändern. Ich bleibe bei der Ansicht, daß ein Stoff wie das Thymol in bezug auf Hämolyse, Narkose usw. in erster Linie physikalisch wirksam ist, wobei gern zugegeben werden kann, daß die Phenolnatur dieses Stoffes die Hämolyse besonders begünstigt, weil die geringste Acidität oder Alkalität beispielsweise die Quellung sehr erheblich erhöht.

Die verschiedene Wirkung optischer Antipoden kann man mit größerem Recht physikalisch als chemisch deuten, und wenn Herr Heubner glaubt, die sehr verschiedene Wirkung der cyclischen Seitenkettenamine lediglich chemisch deuten zu sollen, so teile ich diese Ansicht keineswegs, ohne mich in spezielleren Betrachtungen festlegen zu wollen.

Der Vorwurf des Herrn Heubner, daß ich an Stelle des einen Extrems ein anderes setzen wolle, ist durchaus unberechtigt. Niemals leugne ich, daß zahlreiche Arzneimittel chemische Wirkungen in unserem Körper ausüben, aber ebensosehr bleibe ich auch der Meinung, daß für zahlreiche Arzneimittel die chemische Konstitution nur insoweit bedeutungsvoll ist, als sie die physikalischen Eigenschaften und Wirkungen der Stoffe bestimmt, und es ist durchaus nicht überflüssig, die Herren Chemotherapeuten hierauf und auf die Bedeutung der physikalischen Eigenschaften mit allem Nachdruck aufmerksam zu machen, auch nochmals auf den Wert eines mehr physikalischen pharmakologischen Lehrbuchs hinzuweisen. Selbst auf die Gefahr hin, daß dieser Ausspruch Herrn Heubners Billigung nicht findet, bemerke ich nochmals, daß in etlichen Fällen Tierversuche hätten erspart werden können, wenn man vorher das Stalagmometer befragt hätte, einen Apparat, dessen Wert für mancherlei biologische Probleme ja anerkannt wurde. Die Behauptung, im allgemeinen Maße Tierversuche durch stalagmometrische Messungen zu ersetzen, ist niemals erfolgt, und wenn Herr Heubner seine Mitteilung mit den emphatischen Worten schließt: „Ein lebender Organismus ist ganz gewiß kein Reagenzglas, aber noch viel weniger ein Stalagmometer“, so wird es niemand unter uns geben, der die Wahrheit dieses Satzes bezweifelt, aber auch niemand, der so töricht wäre, derartiges zu behaupten.

---

[1]) Siehe Traube, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 1594. 1909 und Über Halloelektrizität, Molekularkräfte und elektrische Kräfte. Ann. d. Phys., etwa gleichzeitig erscheinend.

Digitized by Google

Chinin und Blut.

II. Mitteilung.

Chininwirkung und paroxysmale Hämoglobinurie.

Von

Stefan Rusznyák.

(Aus der III. med. Klinik der Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 13. Februar 1920.)

Vor kurzem konnte ich mitteilen[1]), daß rote Blutkörperchen in Gegenwart von Chinin durch Kohlensäure aufgelöst werden. Es wurde auch auf die Möglichkeit hingewiesen, daß diese Erscheinung im Mechanismus des Schwarzwasserfiebers eine Rolle spielen könnte. Aus Untersuchungen von Hymans van den Bergh[2]), dessen Befunde von Krokiewicz[3]) bestätigt wurden, geht hervor, daß ähnliche Phänomene auch bei der paroxysmalen Hämoglobinurie auftreten. Van den Bergh fand nämlich, daß das Blut von Kranken mit paroxysmaler Hämoglobinurie bei Zimmertemperatur durch Kohlensäure aufgelöst wird, während ähnlich behandeltes normales Blut unverändert bleibt. Das Blut dieser Patienten verhält sich also wie ein mit Chinin versetztes. Es war demnach von Interesse, die Versuche von Hymans van den Bergh mit chininhaltigem Blute zu wiederholen und die Ähnlichkeiten und Unterschiede dieser anscheinend verwandten Erscheinungen zu untersuchen.

Ich habe mich genau an die Methodik von Hymans van den Bergh gehalten, deren Einzelheiten in seiner interessanten Arbeit zu finden sind. Ich übernehme auch seine Bezeichnungen „s" und „e" = Normalserum und normale Blutkörperchenemulsion, nur bedeuten bei meinen Versuchen „S" und „E" natürlich nicht Patientenserum und Patientenblutkörperchen,

---

[1]) Diese Zeitschr. 104, 9. 1920.

[2]) Berl. klin. Wochenschr. 1909, Nr. 27 u. 35.

[3]) Wien. klin. Wochenschr. 1911, Nr. 14.

Digitized by Google

sondern Serum und Blutkörperchen eines mit Chinin hydrochl. versetzten Blutes. Die Chininkonzentration betrug in allen meinen Versuchen 1 : 600. Die Blutportionen stammen durchweg von Kranken mit Nephrosklerose. Die Ergebnisse werden vielleicht am besten übersichtlich, wenn ich die Tabelle von van den Bergh hier reproduziere und mit den seinen auch parallel meine Befunde darin anmerke.

	Befund von van den Bergh bei paroxysm. Hämoglobinurie	Eigener Befund bei Chininblut
1. S + E während 2 Std. bei 16° C in CO_2	Hämolyse	Hämolyse
2. S + E „ 2 „ „ 37° C in CO_2	θ	θ
3. S + E „ 2 „ „ 16° C an der Luft	θ	θ
4. s + e „ 2 „ „ 16° C in CO_2	θ	θ
5. s + E „ 2 „ „ 16° C in CO_2	θ	Hämolyse
6. S + e „ 2 „ „ 16° C in CO_2	Hämolyse	θ
7. S + e „ 2 „ „ 37° C in CO_2	θ	θ
8. S + e „ 2 „ „ 16° C an der Luft	θ	θ

Aus der ersten Reihe ist zunächst ersichtlich, daß sowohl mit Chinin versetztes Blut wie auch das Blut der Kranken mit paroxysmaler Hämoglobinurie durch CO_2 hämolysiert werden. Diese Wirkung kommt nicht zustande — wie die zweite Reihe zeigt —, wenn das Blut während des Versuches auf 37 erwärmt wird. Die Ursache dieser Erscheinung ist wahrscheinlich der Umstand, daß der Absorptionskoeffizient der Kohlensäure mit steigender Temperatur abnimmt. Reihe 3 und 4 sind Kontrollen, welche besagen, daß einerseits Chinin- und Krankenblut ohne Kohlensäure stundenlang unverändert bleiben, andererseits normales Blut durch CO_2 nicht gelöst wird.

Durch die nächsten beiden Reihen wird die Frage entschieden, ob die Substanz, welche das Blut gegenüber von Kohlensäure „sensibilisiert“, sich im Serum oder in den roten Blutkörperchen befindet. Hier tritt nun ein prinzipieller Unterschied zwischen Chininblut und Krankenblut zutage, denn während van den Bergh diese Substanz im Serum vorfand, findet sich in meinen Versuchen nur eine Veränderung der roten Blutkörperchen, und das abpipettierte Serum erwies sich gegenüber von normalen Blutkörperchen als völlig wirkungslos.

Die beiden letzten Versuchsreihen wurden nur der Vollständigkeit halber ausgeführt und ergaben — wie das zu erwarten war — ein negatives Resultat.

Digitized by Google

Die Beobachtung, daß in meinen Versuchen das Chinin den roten Blutkörperchen anhaftet, stimmt gut mit den bekannten Befunden von Morgenroth und Ginsberg[1]) überein, welche fanden, daß das Chinin in kurzer Zeit durch die roten Blutkörperchen gebunden wird. Ich konnte das auch auf folgende Weise zeigen: Normale gewaschene Blutkörperchen, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, bleiben in einer CO_2-Atmosphäre unverändert, während aus einem mit Chinin versetzten Blute isolierte und gewaschene Blutkörperchen aufgelöst werden. Bei der paroxysmalen Hämoglobinurie, bei welcher sich die „sensibilisierende" Substanz im Serum befindet, verhalten sich die gewaschenen Blutkörperchen der Patienten — wie van den Bergh fand — genau wie die normalen.

Zusammenfassung. Mit Chinin versetztes Blut verhält sich in mancher Hinsicht ähnlich dem Blute eines Kranken mit paroxysmaler Hämoglobinurie. Beide werden durch CO_2 hämolysiert, bei beiden bleibt diese Wirkung bei 37° aus. Ein prinzipieller Unterschied besteht jedoch zwischen beiden darin, daß das Chinin sich an die roten Blutkörperchen bindet, während die unbekannte Substanz bei der Hämoglobinurie sich im Serum befindet.

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 46 und 1913, Nr. 8.

Digitized by Google

Über die Einwirkung von Elektrolyten auf die Ricin-Hämagglutination.

Von

Peter Rona und **Paul György.**

(Aus dem biochemischen Laboratorium des städt. Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 14. Februar 1920.)

In der Erklärung ihrer Befunde bei der Beeinflussung der Ausflockung von Suspensionskolloiden durch capillaraktive Nichtelektrolyte gelangten H. Freundlich und einer von uns (R.) zu der Annahme, daß durch Zufügen von Nichtelektrolyten die Dielektrizitätskonstante des Dispersionsmittels und damit parallel die Ladung der suspendierten Teilchen vermindert und die Stabilität der Suspensionen schon bei einer geringeren Salzkonzentration aufgehoben wird als bei Abwesenheit des Nichtelektrolyten. Die Capillaraktivität der Nichtelektrolyte bewirkt eine Anreicherung (Adsorption) dieser Körper an der Grenzschicht der zwei Phasen, die als Sitz der Helmholtzschen elektrischen Doppelschicht somit der elektrischen Ladung zu betrachten ist. Die verminderte elektrische Ladung findet ihren Ausdruck in einer „größeren Empfindlichkeit", einer „Sensibilisierung" der Suspension gegenüber dem ausflockenden Salz, da die zur Ausflockung erforderliche Entladung der Teilchen bereits bei einer geringeren Salzkonzentration erfolgt.

Es lag nun nahe, einige biologisch wichtige Vorgänge, z. B. die Agglutination, in den Kreis dieser Sensibilisierungserscheinungen einzubeziehen, worauf bereits Freundlich und Rona hingewiesen haben.

Schon Bordet[1]) (1899) versuchte das Problem der Agglutinationsvorgänge von physikalisch-chemischen Gesichtspunkten

[1]) J. Bordet, Le mécanisme de l'agglutination. Ann. de l'inst. Pasteur 10, 225. 1899.

Digitized by Google

aus der Lösung näher zu bringen. Nach ihm soll die Agglutination in zwei Phasen ablaufen: 1. Eine mehr chemische Fixierung des Agglutinins an die agglutinable Substanz, 2. Häufchenbildung, Ausflockung durch physikalisch-chemische Salzwirkung. Ohne Salze keine sichtbare Agglutination. Zum Vergleich mit der späteren Sensibilisierungstheorie von Freundlich und Rona ist es interessant hervorzuheben, daß bereits Bordet zu der Annahme gelangt ist, daß die Agglutinine dadurch, daß sie sich an den agglutinierbaren Elementen fixieren, Modifikationen in der „molekularen Anziehung" herbeiführen, die diese Elemente sowohl unter sich, als mit der umgebenden Flüssigkeit verbindet.

Joos[1]), der die Versuche von Bordet wiederholte, nimmt eine Komplexverbindung an, in der Agglutinin, agglutinable Substanz und auch die Salze nach Gesetzen der chemischen Verbindungen teilnehmen und weicht so von Bordets Deutung der Agglutinationsvorgänge ab. Dagegen bestreitet Friedberger[2]) den Eintritt von Salzen in die Verbindung Agglutinin—agglutinable Substanz und auch Neufeld[3]) hält an der ursprünglichen Fassung Bordets fest.

Erst durch die Versuche von Landsteiner und Jagic[4]), Bechhold[5]), Neisser und Friedemann[6]) bekam jedoch die kolloidchemische Deutung der Agglutinationsvorgänge eine feste Stütze. So vergleichen Landsteiner und Jagic die spezifische Agglutination mit der Fällung durch kolloidale Kieselsäure, und Bechhold sowie Neisser und Friedemann sehen in Beeinflussung des amphoteren Charakters der Bakterieneiweiß-

[1]) Joos, Untersuchungen über den Mechanismus der Agglutination. Zeitschr. f. Hyg. 36, 422; 40, 203. 1902.

[2]) E. Friedberger, Über die Bedeutung anorganischer Salze und einiger organischer krystalloider Substanzen für die Agglutination von Bakterien. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 30, 336. 1901.

[3]) F. Neufeld, Über die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorien der Agglutination. Zeitschr. f. Hyg. 40, 54. 1902.

[4]) K. Landsteiner und Jagic, Über Reaktionen anorganischer Kolloide und Immunkörperreaktionen. Münch. med. Wochenschr. 1904 S. 185.

[5]) H. Bechhold, Die Ausflockung von Suspensionen bzw. Kolloiden und die Bakterienagglutination. Zeitschr. f. physikal. Chem. 48, 385. 1904.

[6]) M. Neisser und U. Friedemann, Studien über Ausflockungserscheinungen I, II. Münch. med. Wochenschr. 1904, S. 465 u. 827.

Digitized by Google

körper sowie in Oberflächenspannungsdifferenzen wichtige Faktoren des Agglutinationsvorganges. Die Stabilität der Bakteriensuspensionen soll, worauf Porges[1]) hinweist, durch die Eiweißkörper der Bakterien bedingt sein (Hemmungskörper), die dann durch Einwirkung des Agglutinins Veränderungen erleiden, die sie der Wirkung der Salze bzw. Ionen zugänglich machen. Einen ähnlichen Standpunkt nehmen auch Biltz[2]) und besonders Buxton und Schaffer[3]), Buxton und Teague[4]) ein. Während Normalbakterien durch ein- und zweiwertige Kationen nicht gefällt werden können, sind Agglutininbakterien — ähnlich den anorganischen Suspensionskolloiden — durch die erwähnten Kationen leicht ausfällbar. Es gelang den Autoren weiterhin nachzuweisen, daß die Fällungskraft parallel mit der Wertigkeit steigt, daß sie von dem Grad der elektrolytischen Dissoziation, der Entladungsspannung, zum Teil von der Wanderungsgeschwindigkeit abhängt. Da die Bakterien im elektrischen Strome zur Anode wandern, sollen Anionen nach den meisten Autoren keine Wirkung auf den Agglutinationsvorgang ausüben, nur Porges und Joos heben auch den Einfluß der Anionen hervor.

Hirschfeld[5]), der in einer ausführlichen Arbeit ebenfalls den physikalisch-chemischen Standpunkt einnimmt, zieht eine Parallele zwischen Bakterien- und Blutkörperchenagglutination. Er stellt es als möglich hin, daß auch die Hämagglutinine der normalen Sera sowie des Abrins nur vorbereitend wirken, die Fällung selbst hingegen den Salzen des umgebenden Mediums zuzuschreiben ist, ohne aber diese Annahme experimentell zu begründen.

Wenn das Vorhandensein von Salzen zur Ausflockung von Bakterien von den meisten Autoren gefordert wird, so sehen

---

[1]) O. Porges, Über die Beziehungen zwischen Bakterienagglutination und Ausflockungserscheinungen der Kolloide. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 40, 133. 1906.

[2]) W. Biltz, Ein Versuch zur Deutung der Agglutinierungsvorgänge. Zeitschr. f. physikal. Chem. 48, 615. 1904.

[3]) B. H. Buxton und Ph. Schaffer, Die Agglutination und verwandte Reaktionen in physikalischer Hinsicht. Zeitschr. f. physikal. Chem. 57, 47. 1907.

[4]) Buxton und O. Teague, Ebenda, S. 64.

[5]) L. Hirschfeld, Untersuchungen über die Hämagglutination und ihre physikalischen Grundlagen. Arch. f. Hyg. 63, 236. 1907.

Digitized by Google

Asakawa[1]) und Furukawa[2]), und in neuerer Zeit Lange[3]) in den Salzen nur Lösungsmittel für Globuline, da sie — vor allem Lange — den Hauptteil des Agglutininfaktors in den Serumglobulinen suchen. Auf diesen Punkt kommen wir noch zurück[4]).

Um den Agglutinationsvorgang im Sinne der Sensibilisierungstheorie zu beleuchten, stellten wir uns die Aufgabe, die Wirkung der Elektrolyte auf die Agglutination von neuem zu untersuchen. Wir wählten als agglutinable Substanz rote Blutkörperchen, als Agglutinin Ricin, erstens aus dem Grunde, weil die Wirkung der Elektrolyte auf die Hämagglutination bis jetzt noch nicht genügend erforscht worden ist, wenn auch die Wahrscheinlichkeit der Notwendigkeit der Salzgegenwart bei der Hämagglutination sehr nahe lag, und zweitens, weil wir in Ricin, wenn auch nicht einen chemisch wohldefinierten Körper, aber doch weniger verwickelte Verhältnisse vorfanden als in den Serumagglutininen.

Experimenteller Teil.

Bereits Stellmack[5]) wies darauf hin, daß verschiedene Blutarten von Ricin verschieden stark agglutiniert werden. Unter die schwer agglutinierbaren Blutkörperchen sind die von Rind, Hammel zu rechnen, während die Blutkörperchen vom Menschen leicht, d. h. in großen Verdünnungen von Ricin noch rasch und vollständig agglutiniert werden können. Aus diesem Grunde verwendeten wir zu unseren Versuchen frisches, geschlagenes Menschenblut. Das Blut wurde zentrifugiert, die Blutkörperchen vom Serum mittelst 0,85 proz. Kochsalzlösung freigewaschen und dann ebenfalls mit physiologischer Kochsalz-

---

[1]) N. Asakawa, Über das Wesen der Agglutination und eine neue Methode, die Agglutination schnell zu beobachten (Gefriermethode). Zeitschr. f. Hyg. 45, 93. 1908.

[2]) J. Furukawa, Agglutination und Salzgehalt. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. Ref. 33, 744. 1903.

[3]) C. Lange, Die Bedeutung der Salze für die spezifische Agglutination. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 24, 587. 1916.

[4]) Vgl. auch Paltauf in Kolle-Wassermann 2.

[5]) Stellmack, Über Ricin. Arbeiten d. pharmakol. Inst. z. Dorpat 3. 1889. Vgl. auch Kolle-Wassermann.

Vgl. auch M. Jacoby, Ricin, Abrin und Crotin und deren Handbuch der pathog. Mikroorganismen 2, 1453. 1913.

Digitized by Google

lösung auf das ursprüngliche Volum (ca. 30%) aufgefüllt und verwendet. Blutkörperchenemulsionen, die wir durch Waschen mit 8proz. Rohrzuckerlösung und durch Suspensierung in derselben oder in einem Gemisch von Rohrzuckerlösung — physiologische Kochsalzlösung — gewonnen hatten, erwiesen sich als unbeständig, agglutinierten spontan nach längerer oder kürzerer Zeit.

Das Ricin (Ricin „Kobert" von Merck) wurde in 8proz. Rohrzuckerlösung gelöst, filtriert und in 1 oder 0,5proz. Konzentration verwendet. Der Einwand von Lange, daß die Salze nur dazu nötig sind, die Globuline in Lösung zu halten, verliert bei unserer Versuchsanordnung seine Gültigkeit da anzunehmen ist, daß die Globuline in der verwandten Rohrzuckerlösung ausgefällt und so beim Filtrieren aus der Lösung entfernt werden. Wenn die Ricinlösung trotzdem Agglutination hervorgerufen hat, so kann diese Wirkung nicht gut einer Globulinfraktion zugeschrieben werden[1]).

Als Salzlösungen kamen zur Verwendung: NaCl, KCl, NaJ, KSCN, $NaNO_3$, K_4FeCy_6, Natriumphosphat-Puffer-Gemisch (1 primär, 7 sekundär), $CaCl_2$, $BaCl_2$, $MgCl_2$, $HgCl_2$, $AlCl_3$, $ThCl_4$ und Strychninnitrat in verschiedenen Konzentrationen.

Zu jeder Versuchsreihe kam eine Kontrollreihe ohne Ricin. Jede Versuchsreihe kam zuerst auf eine halbe Stunde in den Brutschrank (37°) und die Ablesung erfolgte nach verschiedenen Zeiten. Zum Vergleich der Ionenwirkung sind nur Reihen mit gleicher Blutkörperchenaufschwemmung benutzt.

Die Versuchsergebnisse sind in den folgenden Tabellen niedergelegt.

Wie aus den Tabellen klar und eindeutig hervorgeht, kommt die Ricinagglutination ausschließlich in salzhaltiger Lösung zustande. Die verschiedenen Salze beeinflussen in verschiedener Stärke die Agglutination oder um die Ausdrucksweise von Freundlich und Rona zu gebrauchen, die Ionen üben ein verschiedenes Ausflockungsvermögen auf mit Ricin sensibilisierte Blutkörperchen aus. Zweiwertige Kationen haben eine viel stärkere Wir-

[1]) Bei den Ricinreihen ohne Salze fand in unseren Versuchen keine Agglutination statt. Die etwa vorhandenen Globulinmengen, die von den dem Präparat beigemengten Salzen in Lösung gehalten werden konnten, waren jedenfalls unwirksam.

Digitized by Google

Tabelle I.

Nr.	NaCl-Konzentration Millimol-Liter	1 ‰ Ricin ccm	30 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeitsmenge m. Rohrzucker ccm	Agglutination nach 1h	2h
1	—	1	0,5	10	—	—
2	14,5	1	0,5	10	—	—
3	43,5	1	0,5	10	—	—
4	72,5	1	0,5	10	—	+
5	124,4	1	0,5	10	+	+
6	—	—	0,5	10	—	—
7	14,5	—	0,5	10	—	—
8	43,5	—	0,5	10	—	—
9	72,5	—	0,5	10	—	—
10	124,4	—	0,5	10	—	—

Tabelle II.

Nr.	Salzkonzentration Millimol-Liter	1 ‰ Ricin ccm	30 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeitsmenge m. Rohrzucker ccm	Agglutination nach 1h	2h
1	7,25 NaCl	1	0,5	10	—	—
2	13,5 NaCl	1	0,5	10	—	—
3	21,75 NaCl	1	0,5	10	—	±
4	42,0 NaCl	1	0,5	10	—	±
5	72,5 NaCl	1	0,5	10	+	+
6	7,25 $NaNO_3$	1	0,5	10	—	—
7	13,5 $NaNO_3$	1	0,5	10	—	—
8	21,75 $NaNO_3$	1	0,5	10	—	—
9	42,0 $NaNO_3$	1	0,5	10	—	±
10	72,5 $NaNO_3$	1	0,5	10	±	+
11	3,62 Na_2SO_4	1	0,5	10	—	—
12	6,2 Na_2SO_4	1	0,5	10	—	—
13	10,9 Na_2SO_4	1	0,5	10	—	—
14	20,0 Na_2SO_4	1	0,5	10	—	—
15	36,2 Na_2SO_4	1	0,5	10	+	+

In den Kontrollreihen ohne Ricin keine Agglutination.

Tabelle IIa

(mit derselben Blutkörperchenaufschwemmung wie in Tabelle II).

Nr.	Salzkonzentration Millimol-Liter	1 ‰ Ricin ccm	30 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeitsmenge m. Rohrzucker ccm	Agglutination nach 1h	2h
1	3,62 $MgCl_2$	1	0,5	10	—	±
2	6,2 $MgCl_2$	1	0,5	10	—	±
3	10,9 $MgCl_2$	1	0,5	10	±	+
4	20,0 $MgCl_2$	1	0,5	10	+	+
5	36,2 $MgCl_2$	1	0,5	10	+	+
6	3,62 $MgSO_4$	1	0,5	10	—	—
7	6,2 $MgSO_4$	1	0,5	10	—	—
8	10,9 $MgSO_4$	1	0,5	10	—	±
9	20,0 $MgSO_4$	1	0,5	10	±	+
10	36,2 $MgSO_4$	1	0,5	10	+	+

In den Kontrollreihen ohne Ricin keine Agglutination.

Tabelle III.

Nr.	Salzkonzentration Millimol-Liter	0,5 ‰ Ricin ccm	30 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeitsmenge m. Rohrzucker ccm	Agglutination nach 2h	29h
1	—	0,5	0,5	10	—	—
2	0,145 NaCl	0,5	0,5	10	—	—
3	1,45 NaCl	0,5	0,5	10	—	—
4	7,25 NaCl	0,5	0,5	10	—	—
5	72,5 NaCl	0,5	0,5	10	+	+
6	—	0,5	0,5	10	—	—
7	0,1 $CaCl_2$	0,5	0,5	10	—	—
8	1,00 $CaCl_2$	0,5	0,5	10	—	—
9	5,0 $CaCl_2$	0,5	0,5	10	—	±
10	15,0 $CaCl_2$	0,5	0,5	10	±	+

In den Kontrollreihen ohne Ricin keine Agglutination.

kung als einwertige. Bei den drei- und vierwertigen und ebenso bei dem zweiwertigen Schwermetallion Hg^{++} kommt der sensibilisierende Einfluß nicht zur Geltung, da sie auch ohne Ricin schon in minimalen Mengen ausflockend wirken.

Digitized by Google

Tabelle IV.

Nr.	Salzkonzentration Millimol/Liter	1 ‰ Ricinlösung ccm	25 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlsg. (8%) ccm	Agglutination nach 2 Std.	Nr.	Salzkonzentration Millimol/Liter	1 ‰ Ricinlösung ccm	25 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlsg. (8%) ccm	Agglutination nach 2 Std.
1	—	0,5	0,5	10	—	1	—	0,5	0,5	10	—
2	1,45 NaCl	0,5	0,5	10	—	2	0,1 $CaCl_2$	0,5	0,5	10	—
3	7,25 NaCl	0,5	0,5	10	—	3	1,00 $CaCl_2$	0,5	0,5	10	+
4	11,6 NaCl	0,5	0,5	10	—	4	4,85 $CaCl_2$	0,5	0,5	10	+
5	21,75 NaCl	0,5	0,5	10	—	5	7,72 $CaCl_2$	0,5	0,5	10	+
6	29,0 NaCl	0,5	0,5	10	—	6	14,55 $CaCl_2$	0,5	0,5	10	±
7	43,5 NaCl	0,5	0,5	10	±	7	19,4 $CaCl_2$	0,5	0,5	10	±
8	72,5 NaCl	0,5	0,5	10	+	8	29,10 $CaCl_2$	0,5	0,5	10	±

In den Kontrollreihen ohne Ricin keine Agglutination.

Tabelle V.

Nr.	$HgCl_2$-Konzentration Millimol/Liter	1 ‰ Ricinlösung ccm	25 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlsg. (8%) ccm	Agglutination nach 2 Std.	Nr.	$HgCl_2$-Konzentration Millimol/Liter	1 ‰ Ricinlösung ccm	25 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlsg. (8%) ccm	Agglutination nach 2 Std.
1	—	0,5	0,5	10	—	1	—	—	0,5	10	—
2	0,2	0,5	0,5	10	±	2	0,2	—	0,5	10	±
3	0,1	0,5	0,5	10	—	3	0,1	—	0,5	10	—
4	0,05	0,5	0,5	10	—	4	0,05	—	0,5	10	—
5	0,025	0,5	0,5	10	—	5	0,025	—	0,5	10	—
6	0,0125	0,5	0,5	10	—	6	0,0125	—	0,5	10	—
7	0,00625	0,5	0,5	10	—	7	0,00625	—	0,5	10	—
8	0,003125	0,5	0,5	10	—	8	0,003125	—	0,5	10	—

Tabelle VI.

Nr.	$AlCl_3$-Konzentration Millimol/Liter	1 ‰ Ricinlösung ccm	25 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlsg. (8%) ccm	Agglutination nach 2 Std.	Nr.	$AlCl_3$-Konzentration Millimol/Liter	1 ‰ Ricinlösung ccm	25 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlsg. (8%) ccm	Agglutination nach 2 Std.
1		0,5	0,5	10	—	1	—	—	0,5	10	—
2	0,01	0,5	0,5	10	Sp.	2	0,01	—	0,5	10	Sp.
3	0,005	0,5	0,5	10	—	3	0,005	—	0,5	10	—
4	0,0025	0,5	0,5	10	—	4	0,0025	—	0,5	10	—
5	0,00125	0,5	0,5	10	—	5	0,00125	—	0,5	10	—
6	0,000625	0,5	0,5	10	—	6	0,000625	—	0,5	10	—
7	0,0003125	0,5	0,5	10	—	7	0,0003125	—	0,5	10	—

Digitized by Google

Tabell VII.

Nr.	Salzkonzentration Millimol/Liter		0,5 % Ricinlösung ccm	30 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung (8 %) ccm	Agglutination nach 2 Std.	Agglutination nach 24 Std.
1	—		0,5	0,5	10	—	—
2	0,040	ThCl	0,5	0,5	10	±	±
3	0,020	$ThCl_4$	0,5	0,5	10	—	—
4	0,01	$ThCl_4$	0,5	0,5	10	—	—
5	0,005	$ThCl_4$	0,5	0,5	10	—	—
6	0,0025	$ThCl_4$	0,5	0,5	10	—	—
7	0,00125	$ThCl_4$	0,5	0,5	10	—	—
8	0,00062	$ThCl_4$	0,5	0,5	10	—	—
9	—		—	0,5	10	—	—
10	0,04	$ThCl_4$	—	0,5	10	±	±
11	0,02	$ThCl_4$	—	0,5	10	—	—
12	0,01	$ThCl_4$	—	0,5	10	—	—
13	0,005	$ThCl_4$	—	0,5	10	—	—
14	0,0025	$ThCl_4$	—	0,5	10	—	—
15	0,00125	$ThCl_4$	—	0,5	10	—	—
16	0,00062	$ThCl_4$	—	0,5	10	—	—

Tabelle VIII.

Nr.	ThCl-Konzentration Millimol-Liter	1 ‰ Ricinlösung ccm	30 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung (8 %) ccm	Agglutination nach 2 Std.	Agglutination nach 24 Std.	Nr.	$ThCl_4$-Konzentration Millimol-Liter	1 ‰ Ricinlösung ccm	30 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung (8 %) ccm	Agglutination nach 2 Std.	Agglutination nach 24 Std.
1	—	0,5	0,5	10	—	—	1	—	—	0,5	10	—	—
2	0,04	0,5	0,5	10	±	±	2	0,04	—	0,5	10	±	±
3	0,02	0,5	0,5	10	—	Sp.	3	0,02	—	0,5	10	—	Sp.
4	0,01	0,5	0,5	10	—	—	4	0,01	—	0,5	10	—	—
5	0,005	0,5	0,5	10	—	—	5	0,005	—	0,5	10	—	—
6	0,0025	0,5	0,5	10	—	—	6	0,0025	—	0,5	10	—	—

Tabelle IX.

Nr.	Strychnin-Nitrat-Konzentration Millimol-Liter	1 ‰ Ricinlösung ccm	30 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung (8 %) ccm	Agglutination nach 2 Std.	Agglutination nach 24 Std.	Nr.	Strychnin-Nitrat-Konzentration Millimol-Liter	1 ‰ Ricinlösung ccm	30 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung (8 %) ccm	Agglutination nach 2 Std.	Agglutination nach 24 Std.
1	—	0,5	0,5	10	—	—	1	—	—	0,5	10	—	—
2	0,1	0,5	0,5	10	—	—	2	0,1	—	0,5	10	—	—
3	1,0	0,5	0,5	10	—	—	3	1,0	—	0,5	10	—	—
4	5,0	0,5	0,5	10	—	—	4	5,0	—	0,5	10	—	—
5	8,0	0,5	0,5	10	—	—	5	8,0	—	0,5	10	—	—
6	10,0	0,5	0,5	10	—	—	6	10,0	—	0,5	10	—	—
7	15,0	0,5	0,5	10	—	—	7	15,0	—	0,5	10	—	—
8	20,0	0,5	0,5	10	—	—	8	20,0	—	0,5	10	—	—
9	30,0	0,5	0,5	10	—	Sp.	9	30,0	—	0,5	10	—	Sp.

Digitized by Google

Tabelle X.

Nr.	$CaCl_2$-Konzentration Millimol/Liter	0,5 ‰ Ricinlösung ccm	80 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung ccm	Agglutination nach 2 Std.	Agglutination nach 24 Std.	Nr.	$BaCl_2$-Konzentration Millimol/Liter	0,5 ‰ Ricinlösung ccm	80 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung ccm	Agglutination nach 2 Std.	Agglutination nach 24 Std.	Nr.	$MgCl_2$-Konzentration Millimol/Liter	0,5 ‰ Ricinlösung ccm	80 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung ccm	Agglutination nach 2 Std.	Agglutination nach 24 Std.
1	—	0,5	0,5	10	—	—	10	—	0,5	0,5	10	—	—	19	—	0,5	0,5	10	—	—
2	0,14	0,5	0,5	10	—	—	11	0,071	0,5	0,5	10	—	—	20	0,086	0,5	0,5	10	—	—
3	1,4	0,5	0,5	10	—	+	12	0,71	0,5	0,5	10	—	—	21	0,86	0,5	0,5	10	—	—
4	7,0	0,5	0,5	10	±	+	13	3,55	0,5	0,5	10	—	+	22	4,3	0,5	0,5	10	—	+
5	11,2	0,5	0,5	10	±	+	14	5,68	0,5	0,5	10	Sp.	+	23	6,88	0,5	0,5	10	Sp.	+
6	21,0	0,5	0,5	10	±	+	15	10,65	0,5	0,5	10	Sp.	+	24	12,9	0,5	0,5	10	Sp.	+
7	28,0	0,5	0,5	10	±	+	16	14,2	0,5	0,5	10	Sp.	+	25	17,2	0,5	0,5	10	Sp.	+
8	42,0	0,5	0,5	10	+	+	17	21,3	0,5	0,5	10	±	+	26	25,8	0,5	0,5	10	±	+
9	70,0	0,5	0,5	10	+	+	18	35,5	0,5	0,5	10	±	+	27	43,0	0,5	0,5	10	±	+

In den Kontrollreihen ohne Ricin keine Agglutination.

Tabelle XI.

Nr.	$CaCl_2$-Konzentration Millimol/Liter	0,5 ‰ Ricinlösung ccm	80 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung ccm	Agglutination nach 2 Std.	Nr.	$BaCl_2$-Konzentration Millimol/Liter	0,5 ‰ Ricinlösung ccm	80 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung ccm	Agglutination nach 2 Std.	Nr.	$MgCl_2$-Konzentration Millimol/Liter	0,5 ‰ Ricinlösung ccm	80 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung ccm	Agglutination nach 2 Std.
1	—	0,5	0,5	10	—	10	—	0,5	0,5	10	—	19	—	0,5	0,5	10	—
2	0,14	0,5	0,5	10	—	11	0,071	0,5	0,5	10	—	20	0,086	0,5	0,5	10	—
3	1,4	0,5	0,5	10	Spur	12	0,71	0,5	0,5	10	—	21	0,86	0,5	0,5	10	—
4	7,0	0,5	0,5	10	Spur	13	3,55	0,5	0,5	10	—	22	4,3	0,5	0,5	10	—
5	11,2	0,5	0,5	10	Spur	14	5,68	0,5	0,5	10	—	23	6,88	0,5	0,5	10	Spur
6	21,0	0,5	0,5	10	Spur	15	10,65	0,5	0,5	10	Spur	24	12,9	0,5	0,5	10	Spur
7	28,0	0,5	0,5	10	Spur	16	14,2	0,5	0,5	10	„	25	17,2	0,5	0,5	10	Spur
8	42,0	0,5	0,5	10	±	17	21,3	0,5	0,5	10	±	26	25,8	0,5	0,5	10	±
9	70,0	0,5	0,5	10	±	18	35,5	0,5	0,5	10	±	27	43,0	0,5	0,5	10	±

In den Kontrollreihen ohne Ricin keine Agglutination.

Digitized by Google

Tabelle XII.

Nr.	Konzentration Millimol/Liter	1‰ Ricinlösung ccm	25 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung ccm	Agglutination nach 2 Std.	24 S.	Nr.	Konzentration Millimol/Liter	1‰ Ricinlösung ccm	25 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung ccm	Agglutination nach 2 Std.	24 Std.
1	0,145 NaCl	0,5	0,5	10	—	—	19	0,143 $NaNO_3$	0,5	0,5	10	—	—
2	1,45 NaCl	0,5	0,5	10	—	—	20	1,43 $NaNO_3$	0,5	0,5	10	—	—
3	7,25 NaCl	0,5	0,5	10	—	—	21	7,15 $NaNO_3$	0,5	0,5	10	—	—
4	11,6 NaCl	0,5	0,5	10	—	—	22	11,44 $NaNO_3$	0,5	0,5	10	—	—
5	21,75 NaCl	0,5	0,5	10	—	—	23	21,45 $NaNO_3$	0,5	0,5	10	—	—
6	29,0 NaCl	0,5	0,5	10	—	Sp.	24	28,60 $NaNO_3$	0,5	0,5	10	—	—
7	43,5 NaCl	0,5	0,5	10	Sp.	+	25	42,90 $NaNO_3$	0,5	0,5	10	—	—
8	72,5 NaCl	0,5	0,5	10	±	+	26	71,5 $NaNO_3$	0,5	0,5	10	—	Sp.
9	—	0,5	0,5	10	—	—	27	—	0,5	0,5	10	—	—
10	0,072 Na_2SO_4	0,5	0,5	10	—	—	28	0,143 KCNS	0,5	0,5	10	—	—
11	0,72 Na_2SO_4	0,5	0,5	10	—	—	29	1,43 KCNS	0,5	0,5	10	—	—
12	3,62 Na_2SO_4	0,5	0,5	10	—	—	30	7,15 KCNS	0,5	0,5	10	—	—
13	5,8 Na_2SO_4	0,5	0,5	10	—	—	31	11,44 KCNS	0,5	0,5	10	—	—
14	10,82 Na_2SO_4	0,5	0,5	10	—	—	32	21,45 KCNS	0,5	0,5	10	—	—
15	14,5 Na_2SO_4	0,5	0,5	10	—	—	33	28,60 KCNS	0,5	0,5	10	—	—
16	21,75 Na_2SO_4	0,5	0,5	10	—	—	34	42,90 KCNS	0,5	0,5	10	—	—
17	36,25 Na_2SO_4	0,5	0,5	10	Sp.	+	35	71,5 KCNS	0,5	0,5	10	—	—
18	—	0,5	0,5	10	—	—	36	—	0,5	0,5	10	—	—

In den Kontrollreihen ohne Ricin keine Agglutination.

Wir können auf Grund der Versuche folgende Kationenreihe aufstellen:

$$K < Na < Ba\,,\ Mg < Ca\,.$$

Aber auch die Anionen scheinen einen ausgesprochenen Einfluß auf die Ausflockung der sensibilisierten Blutkörperchen auszuüben, im Gegensatz zu der Meinung der verschiedenen, oben erwähnten Autoren

Die Anionen könnte man in der folgenden Reihe ordnen:

$$Cl > So_4 > NO_3 > \text{Phosphat. } FeCy_6,\ SCN,\ J\,,$$

eine Reihe, die sich fast vollkommen mit der Hofmeisterschen Reihe deckt.

Beim Strychninkation kam die sensibilisierende Wirkung, wenigstens bei den verwendeten Konzentrationsverhältnissen nicht zum Vorschein.

Wenn wir die Resultate unserer Versuche mit den aus der Literatur bekannten Versuchen über Bakterienagglutination vergleichen, so ergibt sich zunächst die schon erwähnte eindeutige Tatsache, daß, wie die Bakterienagglutination, so auch die Ricin-

Digitized by Google

Tabelle XIII.

Nr.	Konzentration Millimol/Liter	1‰ Ricinlösung ccm	30 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung ccm	Agglutination nach 2 Std.	Agglutination nach 24 Std.	Nr.	Konzentration Millimol/Liter	1‰ Ricinlösung ccm	30 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung ccm	Agglutination nach 2 Std.	Agglutination nach 24 Std.	Nr.	Konzentration Millimol/Liter	1‰ Ricinlösung ccm	30 proz. Blutkörp.-Aufschw. ccm	Gesamtflüssigkeit mit Rohrzuckerlösung ccm	Agglutination nach 2 Std.	Agglutination nach 24 Std.
1	—	0,5	0,5	10	—	—	19	—	0,5	0,5	10	—	—	37	—	0,5	0,5	10	—	—
2	0,145 NaCl	0,5	0,5	10	—	—	20	0,143 KCl	0,5	0,5	10	—	—	38	0,048 Phosphat	0,5	0,5	10	—	—
3	1,45 NaCl	0,5	0,5	10	—	—	21	1,43 KCl	0,5	0,5	10	—	—	39	0,48 Phosphat	0,5	0.5	10	—	—
4	7,25 NaCl	0,5	0,5	10	—	—	22	7,15 KCl	0,5	0,5	10	—	—	40	2,40 Phosphat	0,5	0,5	10	—	—
5	11,6 NaCl	0,5	0,5	10	—	—	23	11,44 KCl	0,5	0,5	10	—	—	41	3,8 Phosphat	0,5	0,5	10	—	—
6	21,75 NaCl	0,5	0,5	10	±	±	24	21,45 KCl	0,5	0,5	10	—	—	42	7,2 Phosphat	0,5	0,5	10	—	—
7	29,0 NaCl	0,5	0,5	10	±	±	25	28,6 KCl	0,5	0,5	10	Sp.	±	43	9,6 Phosphat	0,5	0,5	10	—	—
8	43,5 NaCl	0,5	0,5	10	±	±	26	42,9 KCl	0,5	0,5	10	Sp.	±	44	14,4 Phosphat	0,5	0,5	10	—	—
9	72,5 NaCl	0,5	0,5	10	+	+	27	71,5 KCl	0,5	0,5	10	Sp.	±	45	24,0 Phosphat	0,5	0,5	10	—	—
10	—	0,5	0,5	10	—	—	28	0,143 KCNS	0,5	0,5	10	—	—	46	—	0,5	0,5	10	—	—
11	0,143 NaJ	0,5	0,5	10	—	—	29	1,43 KCNS	0,5	0,5	10	—	—	47	0,036 $FeCy_6$	0,5	0,5	10	—	—
12	1,43 NaJ	0,5	0,5	10	—	—	30	7,15 KCNS	0,5	0,5	10	—	—	48	0,36 $FoCy_6$	0.5	0,5	10	—	—
13	7,15 NaJ	0,5	0,5	10	—	—	31	11,44 KCNS	0,5	0,5	10	—	—	49	1,8 $FeCy_6$	0,5	0,5	10	—	—
14	11,44 NaJ	0,5	0,5	10	—	—	32	21,45 KCNS	0,5	0,5	10	—	—	50	2,88 $FeCy_6$	0,5	0,5	10	—	—
15	21,45 NaJ	0,5	0,5	10	—	—	33	28,6 KCNS	0,5	0,5	10	—	—	51	5,4 $FeCy_6$	0,5	0,5	10	—	—
16	28,6 NaJ	0,5	0,5	10	—	—	34	42,9 KCNS	0,5	0,5	10	—	—	52	7,2 $FeCy_6$	0.5	0,5	10	—	—
17	42.9 NaJ	0,5	0,5	10	—	—	35	71,5 KCNS	0,5	0,5	10	—	—	53	10,8 $FeCy_6$	0,5	0,5	10	—	—
18	71,5 NaJ	0,5	0,5	10	—	—	36	—	0,5	0,5	10	—	—	54	18,0 $FoCy_6$	0,5	0,5	10	—	—

In den Kontrollreihen ohne Ricin keine Agglutination.

Digitized by Google

Hämagglutination in salzfreiem Medium nicht stattfinden kann. Die Beladung der roten Blutkörperchen mit Ricin bewirkt eine Sensibilisierung der roten Blutkörperchen, ebenso wie die der Bakterien mit Agglutinin und setzt den Schwellenwert der zur Ausflockung nötigen Elektrolytmenge beträchtlich herab. Wie bei der Bakterienagglutination vermindert sich dieser Schwellenwert mit der Wertigkeit. Die schon ohne Sensibilisierung wirksamen drei und vierwertigen Kationen verhalten sich bei der Hämagglutination ebenso wie bei der Bakterienagglutination.

Die gefundenen Ergebnisse stehen mit der Theorie von Freundlich und Rona in gutem Einklang, wonach die Sensibilisierung der Blutkörperchen auf der verringerten Ladung derselben beruht. Damit stimmt der mit der Wertigkeit parallel gehende Schwellenwert der Kationen. Die Wirkung auch der Anionen hängt mit der amphoteren Natur der Eiweißkörper zusammen. Die starke Adsorbierbarkeit des Hg^{+}, des Al^{+++} und Th^{++++} erklärt sehr gut auf Grund der analytischen Behandlung der Adsorptionsisotherme das Konstantbleiben des Schwellenwertes dieser Kationen.

Bei den beiden besonders stark sensibilisierenden Stoffen, Campher und Thymol, gelang es Freundlich und Rona eine deutliche Verkleinerung der kataphoretischen Wanderungsgeschwindigkeit nachzuweisen. Da sich die verringerte Ladung in einer Verkleinerung der kataphoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der Kolloidteilchen geltend machen muß, so beweist der kataphoretische Versuch mit Campher und Thymol eine Herabsetzung der Ladung der Kolloidteilchen. Aber schon Freundlich und Rona deuten auf die Unzulänglichkeit der Methode hin, wo Unterschiede von 10—20% der Beobachtung entgehen können.

In der folgenden Tabelle haben wir die Versuche zusammengestellt, in denen die kataphoretische Geschwindigkeit im Burtonschen Apparat von mit Ricin beladenen und nicht beladenen Blutkörperchen miteinander verglichen wurde. Die Zusammensetzung der Suspension war: 17 ccm 8 proz. Rohrzuckerlösung und 1 ccm 30 proz. Blutkörperchenaufschwemmung und 2 ccm 1 proz. Ricinlösung oder 8 proz. Rohrzuckerlösung. Wie aus der Tabelle ersichtlich, konnte ein sicherer Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit zwischen unbeladenen und mit

Digitized by Google

Tabelle XIV.

Zeit in Minut.	Wanderung d. Blutkörp. i. mm		Wanderung d. Blutkörp. i. mm		Wanderung d. Blutkörp. i. mm		Wanderung d. Blutkörp. i. mm		Wanderung d. Blutkörp. i. mm		Wanderung d. Blutkörp. i. mm	
	mit Ricin belad.	unbeladen	mit Ricin belad.	unbeladen	mit Ricin belad.	unbeladen	mit Ricin belad.	unbeladen	mit Ricin belad.	unbeladen	mit Ricin belad.	unbeladen
1	0,4	0,6	0,3	0,6	0,7	0,5	0,4	0,6	0,1	0,2	0,5	0,2
2	0,8	0,7	0,8	1,1	1,2	0,8	0,9	1,0	0,3	0,7	1,1	1,0
3	1,2	1,6	1,2	1,6	1,7	1,6	1,3	1,3	0,8	1,1	1,5	1,3
4	1,8	2,4	2,0	2,1	1,9	1,7	1,8	2,0	1,1	1,7	1,9	1,7
5	2,0	2,4	2,2	2,3	2,2	2,2	2,0	2,1	1,6	2,0	2,0	2,1
6	2,4	2,6	2,5	2,8	2,7	2,6	2,3	2,5	2,0	2,7	2,2	2,3
7	2,9	3,0	2,9	3,1	2,9	2,7	2,9	3,0	2,3	3,0	2,7	2,7
8	3,2	3,5	3,2	3,3	3,2	2,9	3,1	3,5	2,7	3,3	3,0	3,0
9	3,4	3,7			3,5				3,1	3,7	3,1	3,2
10	3,8	4,0										

Ricin beladenen Blutkörperchen nicht wahrgenommen werden, wenn auch die Wanderungsgeschwindigkeit der mit Ricin beladenen Blutkörperchen meist hinter den unbeladenen Blutkörperchen ein wenig zurückblieb.

Zusammenfassung.

1. Die Ricinagglutination der Blutkörperchen erfolgt ausschließlich in Gegenwart von Elektrolyten.

2. Es konnte in bezug auf die fällende Kraft eine Kationen- und weniger ausgeprägt eine Anionenreihe aufgestellt werden. Die Wirksamkeit der Kationen wächst mit der Wertigkeit, allein bei drei- oder vierwertigen Kationen tritt die sensibilisierende Wirkung nicht mehr in die Erscheinung.

3. Die Ricinagglutination wird als ein Sensibilisierungsvorgang betrachtet, im Sinne von Freundlich und Rona.

4. Im einfachen, halbquantitativen kataphoretischen Versuch konnte ein Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit der mit Ricin beladenen und nicht beladenen Blutkörperchen nicht sicher beobachtet werden.

Digitized by Google

Untersuchungen über Sedimentierung.

Von

Peter Rona und Paul György.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des städt. Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 14. Februar 1920.)

Eingehende Untersuchungen über Sedimentierung verdanken wir G. Bodländer[1]). Er prüfte das Verhalten des Kaolins und fand, daß alle im Wasser löslichen Stoffe sich in ihrer Einwirkung auf Kaolinsuspensionen in zwei Gruppen teilen lassen; in solche, die schon in sehr kleinen Mengen eine schnelle Klärung bewirken und in solche, die auch in den größten Mengen wirkungslos sind. Zu den ersteren gehören die Elektrolyte, zu den letzteren die Nichtelektrolyte. Geprüft wurden von den Nichtleitern: Methyl, Äthyl-, Isobutylalkohol, Äthyläther, Rohrzucker, ferner Acetaldehyd, Paraldehyd, Aceton, Traubenzucker, Milchzucker, Phenol, β-Naphthol, Anilin. — Eine Beschleunigung der Sedimentierung konnte bei diesen Körpern in keinem Fall beobachtet werden; im Gegenteil schien es, als ob diese Zusätze zum Teil, vielleicht infolge der Vergrößerung der Zähigkeit, das Absetzen verzögern.

Bei der theoretischen und praktischen Wichtigkeit dieser Beobachtung schien es uns von Interesse, die Untersuchung über die Beeinflussung der Sedimentierung des Kaolins durch Nichtelektrolyte einer neuerlichen experimentellen Prüfung zu unterziehen, zumal gerade in der letzten Zeit manche neuen Gesichtspunkte zu der Frage über die Rolle von Nichtelektrolyten bei Suspensionskolloiden und über die Wechselwirkung zwischen Elektrolyten und Nichtelektrolyten gewonnen worden sind[2]).

---

[1]) G. Bodländer, Versuche über Suspensionen I. Neues Jahrbuch f. Mineralogie usw. 2, 147. 1893. (Hier auch ältere Literatur.)

[2]) Vgl. H. Freundlich und P. Rona, Über die Sensibilisierung der Ausflockung von Suspensionskolloiden durch capillaraktive Nichtelektrolyte. Diese Zeitschr. 81, 89. 1917; ferner H. R. Kruyt und C. F. van Duin, Der Einfluß capillaraktiver Stoffe auf suspensoide Hydrosole. Kolloidchem. Beih. 5, 269. 1914; P. Rona und L. Michaelis, Über Adsorption von Elektrolyten durch Kohle. Diese Zeitschr. 94, 240. 1919.

Digitized by Google

Wir benutzten zu den Versuchen gleich lange und breite in Millimeter geteilte Zylinder. Das Kaolin war ein Mercksches Präparat von sehr fein pulveriger Beschaffenheit. In allen Versuchen wurden 3 g Kaolin in 25 ccm der entsprechenden Flüssigkeit durch Schütteln gleichmäßig verteilt und dann in die Zylinder gefüllt. Die anfängliche Höhe der Suspensionen war überall die gleiche und war bei der Marke 25. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt. In bestimmten Zeitabschnitten wurde die Höhe der Kaolinsäule, die gegen die darüberstehende wasserklare Flüssigkeit scharf abschnitt, abgelesen, Als Vergleich diente überall die Sedimentierung des Kaolins im destillierten Wasser.

Als Nichtelektrolyte wurden benutzt:

Methylalkohol (1 molare L.), Äthylalkohol (1 molare L.), Isopropylalkohol (1 molare L.), Amylalkohol (kalt gesättigte L.), Heptylalkohol (kalt gesättigte L.), normal Octylalkohol (kalt gesättigte L.), sekund. Octylalkohol (kalt gesättigte L.), Decylalkohol (kalt gesättigte L.; kolloidal), Methylurethan (1 molare L.), Äthylurethan (1 molare L.), Propylurethan ($^1/_2$ molare L.), Isobutylurethan ($^1/_{10}$ molare L.), Phenylurethan (kalt gesättigte L.), Diphenylsulfoharnstoff (kalt gesättigte L.), Chloroform (kalt gesättigte L.), Tributyrin (kalt gesättigte L.), Campher (kalt gesättigte L.), Thymol (kalt gesättigte Lösung).

Die einzelnen Versuche sind in den folgenden Tabellen wiedergegeben.

I. Versuch.

(Kaolin 3 g auf 25 ccm Flüssigkeit).

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach		
		45′	2 Std.	5 Std.
1	Destilliertes Wasser	21,5	19,3	16,5
2	Äthylurethan 1 n	16,5	15,0	13,0
3	Aceton. 10 proz. Lösung	16,5	14,9	13,0
4	Gesättigte Campherlösung . . .	16,0	14,2	12,0
5	Gesättigte Thymollösung	15,0	13,5	11,5

II. Versuch.

(Kaolin 3 g auf 25 ccm Flüssigkeit).

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		20′	40′	2 Std.	4 Std.
1	Destilliertes Wasser	23,0	22,0	19,2	18,2
2	Urethan 1 n.	19,0	16,0	13,5	13,0
3	Aceton 10%	17,0	14,5	11,7	11,0
4	Gesättigte Thymollösung . .	17,5	16,0	13,4	12,5

Digitized by Google

III. Versuch.

(Kaolin 3 g auf 25 ccm Flüssigkeit).

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		30′	60′	90′	120′
1	Destilliertes Wasser	19,2	17,8	17,0	16,6
2	Gesättigte Thymollösung . .	16,2	14,9	14,4	14,0
3	Gesättigte Thymollösung 1:2	17,4	15,0	15,0	14,8
4	Gesättigte Thymollösung 1:4	17,6	15,1	15,1	15,0

IV. Versuch.

(Kaolin 3 g auf 25 ccm Flüssigkeit).

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach		
		25′	60′	90′
1	Destilliertes Wasser	22,0	19,6	18,4
2	Gesättigte Thymollösung	18,6	16,4	15,6
3	Gesättigte Thymollösung 1:10 .	19,0	16,8	16,0
4	Gesättigte Thymollösung 1:20 .	17,0	15,0	14,0

V. Versuch.

(Kaolin 3 g auf 25 ccm Flüssigkeit).

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		15′	30′	60′	90′
1	Destilliertes Wasser	22,6	20,2	18,6	17,2
2	Gesättigte Thymollösung 1:10	18,6	17,5	16,5	15,9
3	Gesättigte Thymollösung 1:20	19,0	16,3	15,0	14,3
4	Gesättigte Thymollösung 1:40	20,0	17,8	16,8	16,0

VI. Versuch.

(Kaolin 3 g auf 25 ccm Flüssigkeit).

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach		
		15′	110′	150′
1	Destilliertes Wasser	23,0	19,2	18,2
2	Gesättigte Campherlösung . . .	20,0	17,0	16,4
3	Gesättigte Campherlösung 1:2 .	19,8	15,6	14,0
4	Gesättigte Campherlösung 1:4 .	20,0	15,2	14,6

VII. Versuch.

(Kaolin 2 g auf 25 ccm Flüssigkeit).

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		15	35	65′	110
1	Destilliertes Wasser	15,1	13,1	11,8	10,5
2	Campher, gesättigt	12,0	10,8	9,9	8,9
3	Tributyrin, gesättigt	13,0	10,6	9,5	8,5
4	Chloroform, gesättigt	12,9	11,4	10,2	9,1
5	Äthyläther, gesättigt	12,5	11,2	10,0	9,0
6	Thymol, gesättigt	14,3	12,3	11,0	9,7
7	Aceton	16,4	13,3	11,8	10,5

Digitized by Google

VIII. Versuch.

(Kaolin 3 g auf 25 ccm Flüssigkeit).

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		15′	30′	60′	90′
1	Destilliertes Wasser	23,0	16,0	14,0	13,0
2	10 proz. Aceton	19,6	13,8	12,3	11,5
3	5 proz. Aceton	16,7	11,8	10,6	9,8

IX. Versuch.

(Kaolin 3 g auf 25 ccm Flüssigkeit).

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		15′	30′	60′	90′
1	Destilliertes Wasser	23,6	21,9	19,7	18,9
2	Methylalkohol	23,7	22,2	21,0	20,0
3	Äthylalkohol	22,4	20,8	18,9	17,7
4	Isopropylalkohol	21,3	17,6	14,0	13,0
5	Amylalkohol	22,1	17,5	15,5	14,4
6	Heptylalkohol	19,5	16,1	14,7	13,7
7	Norm. Octylalkohol	19,2	17,0	15,5	14,6

IXa. Versuch.

(Kaolin 3 g auf 25 ccm Flüssigkeit.)

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		30′	60′	120′	180′
1	Destilliertes Wasser	23,6	22,8	21,2	20,0
2	Sek. Octylalkohol	22,5	20,2	17,8	15,3
3	Decylalkohol	22,3	19,6	17,2	15,7

X. Versuch.

(Kaolin 3 g auf 25 ccm Flüssigkeit.)

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		15′	30	60′	90′
1	Destilliertes Wasser	23,6	23,0	21,1	19,4
2	Methylurethan	23,7	23,2	21,4	19,9
3	Äthylurethan	23,4	21,6	19,6	18,0
4	Propylurethan	23,6	22,4	19,1	17,5
5	Isobuthylurethan	23,7	19,5	16,7	15,1
6	Phenylurethan	23,9	23,0	21,4	20,0

XI. Versuch.

(Kaolin 3 g auf 25 ccm.)

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach		
		15′	30′	60′
1	Destilliertes Wasser	20,6	16,7	14,8
2	Phenylurethan	20,6	15,6	13,8
3	Diphenylsulfoharnstoff	21,8	17,8	14,8

Digitized by Google

Aus den mitgeteilten Versuchen ist es nun klar ersichtlich, daß die Nichtelektrolyte die Sedimentierungsgeschwindigkeit des Kaolins fast ausnahmslos wesentlich beeinflußt haben, und zwar in dem Sinne, daß die Sedimentierung eine Beschleunigung erfahren hat.

So sehen wir bei Campher, Thymol, Aceton Höhenunterschiede der Kaolinsäule im Vergleich zur wässerigen Suspension bis über $^1/_2$ cm. Im allgemeinen wirkt Campher stärker als Aceton, Thymol stärker als Campher. Bei homologen Reihen stieg die die Sedimentierung beschleunigende Wirkung mit der Länge der Kette, nur bei Verbindungen, die in Wasser so gut wie unlöslich sind, blieb eine nachweisbare Wirkung aus. Betrachten wir z. B. die Alkoholreihe, so steigt die Wirkung von Äthylalkohol zum Isopropylalkohol ganz bedeutend an. Bei dem sehr schwer löslichen Amyl-, Heptyl-, Octylalkohol ist der absolute Betrag der Beeinflussung zwar geringer wenn auch im Vergleich zum „Wasserversuch" noch immer ansehnlich; auf die molare Konzentration bezogen, nimmt sie jedoch entsprechend der Reihe zu. — Bei den Urethanen liegen die Verhältnisse ebenso. Vom Äthylurethan steigt die Wirkung bis zum Isobutylurethan; bei dem fast unlöslichen Phenylurethan ist keine Wirkung mehr zu beobachten.

Bei der Deutung dieser Ergebnisse muß zunächst darauf hingewiesen werden, daß die Viscosität des Mediums durch Zufügen des Nichtelektrolyten entweder gar nicht oder im Sinne einer (meist geringfügigen) Erhöhung der Viscosität geändert wird, also in einem die Sedimentierung hemmenden Sinne. So waren die entsprechenden Ausflußgeschwindigkeiten gemessen bei 18°, im Ostwaldschen Viscosimeter (die Konzentration wie oben angegeben):

Beim destillierten Wasser 1′ 32″, Campher 1′ 32″, Thymol 1′ 30″, Propylalkohol 2′ 2″, Amylalkohol 1′ 47″, normal Octylalkohol 1′ 36″, sekund. Octylalkohol 1′ 41″, Propylurethan 1′ 57″, Isobutylurethan 1′ 40″.

Eine befriedigende Einsicht in die Verhältnisse gewinnt man hingegen durch die Vorstellung, daß die Nichtelektrolyte nicht direkt, sondern auf dem Umwege der „Sensibilisierung" die Sedimentierung beeinflussen. Indem sie die elektrische Ladung der suspendierten Teilchen durch Herabsetzung der Dielektrizitätskonstante des Mediums (beziehungsweise in der Grenzschicht fest — flüssig) vermindern, erniedrigen sie den „Schwellenwert"

Digitized by Google

der in der Suspension stets vorhandenen Elektrolyten, der, nach Bodländers Untersuchungen für die Elektrolytwirkung nötig ist. Der Elektrolyt rückt so in die „Schwellenzone" (Zsigmondy[1]) und die zur Sedimentierung erforderliche Entladung der Teilchen erfolgt bereits bei einer Konzentration, die unter normalen Verhältnissen unwirksam ist.

Von theoretischem Standpunkt ist nun von Interesse, daß eine ähnliche Beeinflussung der Sedimentierung durch Nichtelektrolyte bei Kohlensuspensionen (benutzt wurde Carbo animal. puriss. Merck) nicht oder nur andeutungsweise beobachtet wurde. Dies zeigen folgende Tabellen:

I. Versuch.

(Kohle 1 g auf 25 ccm Flüssigkeit.)

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach		
		60′	90′	4½h
1	Destilliertes Wasser	17,5	13,0	10,0
2	Urethan 1 n	11,0	9,0	8,5
3	Aceton	19,5	12,5	9,5
4	Thymol, gesättigt	15,0	10,0	8,5

II. Versuch.

(Kohle 2 g auf 25 ccm Flüssigkeit.)

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		15′	30′	60,	90′
1	Destilliertes Wasser	22,3	20,8	18,0	15,6
2	Campher	22,8	20,8	17,9	15,5
3	Thymol	22,8	21,2	18,3	15,7
4	Tributyrin	22,3	20,7	18,0	15,6
5	Äthyl. Äther	23,0	21,2	18,9	17,1
6	Chloroform	22,0	20,3	17,6	15,2
7	Aceton 10%	22,8	21,4	18,7	15,9

III. Versuch.

(Kohle 2 g auf 25 ccm Flüssigkeit.)

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		15′	30′	60′	90′
1	Destilliertes Wasser	22,8	21,3	18,1	16,3
2	Methylalkohol	22,5	21,1	18,2	16,6
3	Äthylalkohol	23,0	21,7	19,0	17,2
4	Isopropylalkohol	23,0	21,7	19,0	17,3
5	Amylalkohol	22,7	21,2	18,5	17,1
6	Heptylalkohol	22,8	21,6	18,9	17,3
7	Norm. Octylalkohol	22,3	21,0	18,6	17,2

[1]) R. Zsigmondy, Kolloidchemie. O. Spamer Leipzig 1918, 2. Aufl., S. 66.

Digitized by Google

IIIa. Versuch.
(Kohle 2 g auf 25 ccm Flüssigkeit.)

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		15′	30′	60′	90′
1	Destilliertes Wasser	22,8	21,4	17,9	14,8
2	Sek. Octylalkohol	22,9	21,6	18,4	16,4
3	Decylalkohol	22,8	21,3	17,6	15,2

IV. Versuch.
(Kohle 4 g auf 50 ccm Flüssigkeit).

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		30′	60′	90′	120′
1	Destilliertes Wasser	21,2	18,0	16,0	14,5
2	Methylalkohol	20,6	17,0	15,0	13.7
3	Äthylalkohol	21,3	18,0	15,8	14,0
4	Propylalkohol	21,3	18,5	16,5	14,7
5	Amylalkohol	19,7	17,5	16,4	15,2
6	Heptylalkohol	21,0	18,2	16,5	15,1
7	Norm. Octylalkohol	19,6	16,4	14,8	13,7

IVa. Versuch.
(Kohle 4 g auf 50 ccm Flüssigkeit).

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		30′	60′	90′	120′
1	Destilliertes Wasser	21,0	17,2	15,3	14,3
2	Sek. Octylalkohol	21,5	17,7	15,2	14,0
3	Decylalkohol	21,0	16,4	14,0	12,8

V. Versuch.
(Kohle 4 g auf 50 ccm Flüssigkeit).

Nr.	Suspensionsflüssigkeit	Sedimentierung nach			
		30′	60′	90′	120′
1	Destilliertes Wasser	21,5	18,8	16,3	15,0
2	Methylurethan	20,0	16,9	14,7	15,7
3	Propylurethan	20,5	17,5	16,3	15,5
4	Isobutylurethan	19,4	17,7	16,7	16,2
5	Phenylurethan	21,2	18,5	16,3	15,1
6	Diphenylsulfoharnstoff . .	20,5	17,5	15,2	14,2

Diese Erscheinung stimmt gut mit früheren Beobachtungen überein, wonach Kohle gegen Wasser keine (bzw. nur eine geringe) elektrische Ladung besitzt[1]), und sie stützt andererseits die An-

[1]) Vgl. P. Rona und L. Michaelis, Über die Adsorption von H- und OH-Ionen und der Schwermetallionen durch Kohle. Diese Zeitschr. 97, 85. 1919.

Digitized by Google

sicht, daß beim Kaolin der Beeinflussung des Absetzens eine Änderung der Ladung der suspendierten Teilchen durch Nichtelektrolyte zugrunde liegt.

Untersuchungen über die Sedimentierung der Blutkörperchen im Sinne der hier erhobenen Befunde sind im Gange.

Zusammenfassung.

1. Die Sedimentierung des Kaolins wird durch Nichtelektrolyte im Sinne einer Erhöhung der Sedimentierungsgeschwindigkeit wesentlich beeinflußt.

2. In den homologen Reihen wächst die Wirkung der Nichtelektrolyte mit der Länge der Kette.

3. Die Erscheinung läßt sich auf eine Sensibilisierung der suspendierten Teilchen gegen die in der Suspension vorhandenen Elektrolyte durch die Nichtelektrolyte zurückführen.

4. Für diese Auffassung spricht auch, daß die Sedimentierungsgeschwindigkeit von Kohle durch Nichtelektrolyte nicht beeinflußt wird.

Digitized by Google

Pharmakologische Wirkungen von Reduktionsprodukten des Cumarins.

Von
K. Fromherz.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. B.)

(Eingegangen am 14. Februar 1920.)

Nach Untersuchungen von A. Ellinger[1]) besitzt das Cumarin pharmakologische Eigenschaften, die denen der brauchbaren Hypnotica nahestehen. Das Cumarin hat einen sehr hohen Teilungskoeffizienten Öl zu Wasser; es verursacht beim Frosch in Gaben von 10 mg Narkose; auch beim Kaninchen tritt nach 0,2—0,3 g Cumarin pro Kilo Narkose ein, jedoch verbunden mit Temperatursturz und Kollaps. Ferner sind beim Warmblüter ungünstige Nebenwirkungen zu beobachten, wie Nierenreizungen und Magen-Darmstörungen. Versuche am Menschen erschienen deshalb nicht rätlich.

Gelegentlich seiner Forschung über die Wirkungen des Santonins stellte P. Trendelenburg[2]) fest, daß die Wurmwirkungen im wesentlichen an das Vorhandensein einer Lactongruppe geknüpft sind; die entsprechenden Säuren oder ihre Salze dagegen sind wirkungslos. Dabei konnte er feststellen, daß auch das Cumarin als Lacton am Regenwurm nach vorangehender Erregung narkotische Wirkungen besitzt sowie die isolierte Muskulatur des Wurms erregt.

Diese beobachteten Eigenschaften des Cumarins erlaubten die Vermutung, daß man durch Reduktion dieses Lactons zu Stoffen gelangen könnte, die vermöge stärkerer Wirkung und schwächerer Nebenwirkungen für die praktische Verwendung als Schlafmittel oder als Wurmmittel geeignet wären. Wir haben deshalb einige Reduktionsprodukte des Cumarins auf ihre Wir-

---

[1]) A. Ellinger, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 1908. Supplementbd. S. 150.

[2]) P. Trendelenburg, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 79, (1915). 9, 190.

Digitized by Google

kungen im tierischen Organismus untersucht und mit dem Cumarin selbst verglichen.

Hydrocumarsäure, $C_6H_4 \begin{matrix} \cdot CH_2CH_2COOH \\ OH \end{matrix}$, wurde als Nebenprodukt bei der Darstellung des Oxyphenylpropylalkohols erhalten und durch Umkrystallisieren gereinigt. Eingespritzt als 10 proz. wässerige Lösung des Natriumsalzes hat sie beim Frosch keine narkotische Wirkung; 50 mg sind wirkungslos, 100 mg verursachen unter fortschreitenden Lähmungen den Tod. Am isolierten Froschherz besitzt die Lösung des hydrocumarsauren Natriums nur eine geringe negativ inotrope Wirkung in einer Verdünnung 1 : 100, während Cumarin 1 : 2000 noch diastolischen Stillstand verursacht.

Melilotol, das $C_6H_4 \begin{matrix} \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \\ O \text{———————} \end{matrix}$, Lacton der Hydrocumarsäure, unterscheidet sich von dem ungesättigten Cumarin nicht unwesentlich dadurch, daß es viel leichter unter Wasseraufnahme in schwach alkalischer Lösung in die Säure bzw. das Na-Salz derselben übergeht. Es besitzt am Frosch eine narkotische Wirkung, die, entsprechend der leichten Aufspaltbarkeit dieses Lactonrings, viel flüchtiger ist als die des stabileren Cumarins; auch sind wesentlich höhere Dosen bei Melilotol erforderlich.

Versuch 1. Rana temporaria, 30 g, erhält $10^{h\,10}$ 40 mg Melilotol in den Bauchlymphsack: 11^{h} o. B. — $11^{h\,30}$: Rückenlage kurz ertragen. — $2^{h\,05}$: aus Rückenlage unfähig sich aufzurichten; kein Sprung mehr auf Kneifen; starke Herabsetzung der Reflexerregbarkeit. — $3^{h\,30}$: Rückenlage völlig ertragen, doch nicht völlig reflexlos. — $6^{h\,00}$: wieder munter; keine Rückenlage mehr.

Am isolierten Froschherz verursacht das Melilotol in denselben Konzentrationen wie das Cumarin eine glatt reversible Narkose: Die Lösungen 1 : 2000 beider verursachen noch diastolischen Stillstand. Die Lösung 1 : 4000 hat noch eine starke negativ inotrope Wirkung. Durch Spülen mit Ringerlösung ist rasch Erholung herbeizuführen. Eine Steigerung der Wirksamkeit gegen Cumarin besteht also nicht.

Am Regenwurm bewirkt das Melilotol in einer Verdünnung 1 : 1000 Lähmung ohne vorherige Erregung; schwächere Lösungen sind unwirksam. Die Wirkung ist durch Einbringen in frisches Wasser rasch rückgängig zu machen. Cumarin lähmt in derselben Verdünnung, jedoch geht ein deutliches Erregungsstadium voraus.

Digitized by Google

o-Oxyphenylpropylalkohol, $C_6H_4\genfrac{}{}{0pt}{}{\cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot OH}{OH \cdot}$, das nächst niederere Reduktionsprodukt des Cumarins, wurde ebenso wie sein Anhydrid, das Chroman, nach der Vorschrift von Semmler[1]) dargestellt. Bei der Darstellung dieser Präparate ist die Verunreinigung der Produkte durch Hydrocumarsäure und Melilotol möglich. Durch entsprechende Reinigung wurde diese Möglichkeit ausgeschlossen und durch Titration der verwendeten Präparate die Abwesenheit dieser Nebenprodukte nachgewiesen.

Der Phenolalkohol besitzt ebenfalls narkotische Eigenschaften: Beim Grasfrosch verursachen 4 mg pro 30 g Körpergewicht noch Narkose von mehrstündiger Dauer.

Versuch 2. Rana temp., 20 g, erhält 1^h mittags 4 mg des Phenolalkohols in den Bauchlymphsack. — 3^h: Rückenlage, keine Reaktion auf Reize. — 5^h: unverändert. — Anderen Tags: Rückenlage noch ertragen, jedoch auf Reize wieder Reaktion. — Überlebt.

8 mg sind tödlich. Das Präparat ist also etwas giftiger als Cumarin.

Auch bei der Ratte besitzt der o-Oxyphenylpropylalkohol narkotische Eigenschaften. Vermittels der Eisenchloridreaktion läßt sich seine Ausscheidung im Harn nachweisen.

Chroman, $C_6H_4\genfrac{}{}{0pt}{}{\cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2}{O \text{———————}\rfloor}$, das Anhydrid des o-Oxyphenylpropylalkohols, wirkt etwa in denselben Dosen narkotisch wie das Cumarin und der Phenolalkohol.

Versuch 3. Rana temp., 25 g, erhält 3^h 5 mg Chroman in den Bauchlymphsack. — 5^h: Rückenlage ertragen, jedoch auf Reiz noch Reaktion. — Anderen Tags: 9^h vorm.: Rückenlage ertragen; Schlaf; nur bei starkem Kneifen der Beine noch schwache Reaktion. — Nachmittags wieder o. B.

10 mg sind tödlich, 2,5 mg verursachen nur kurzdauernde Hypnose, keine Narkose. Es besteht also kein Unterschied gegenüber dem Cumarin.

Auch bei der Ratte und bei der Maus sind durch das Chroman narkotische Wirkungen festzustellen. Dieselben sind jedoch schwach, und die tödlichen Dosen liegen der eben noch narkotisch wirksamen Dose sehr nahe:

Versuch 4. Ratte 150 g, erhält $4^{h\,45}$ 0,2 g Chroman subcutan. 5^h: Das Tier taumelt, ist stark ataktisch, Seitenlage wird nicht ertragen, —

[1]) Semmler, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 2856.

Digitized by Google

$5^{h\,30}$: Seitenlage ertragen, nach einiger Zeit jedoch wieder Bauchlage. — $6^{h\,30}$: völlig reaktionslos; tiefe Narkose. — Über Nacht im Wärmekasten; anderen Tags tot aufgefunden.

0,1 g pro 150 g Ratte sind nicht imstande, völlige Narkose hervorzurufen.

Am isolierten Froschherz verursacht das Chroman in denselben Dosen wie das Cumarin und Melilotol Lähmung und diastolischen Stillstand. Die Lösung 1 : 2000 in Ringer bringt das Herz noch zum Stillstand, die Lösung 1 : 4000 hat noch starke, negativ inotrope Wirkung. Die Wirkungen sind durch Spülen mit Ringerlösung prompt reversibel.

Die Wirkung auf den Regenwurm ist beim Chroman etwas stärker als beim Cumarin. Schon die Lösung 1 : 4000 lähmt den Regenwurm nach vorausgehender kurzer Erregung. Die Lösung 1 : 10 000 wirkt noch erregend. Auch diese Wirkungen sind durch Einbringen des Wurmes in frisches Wasser sofort rückgängig zu machen.

Aus diesen Versuchen war der Schluß zu ziehen, daß die untersuchten Reduktionsprodukte des Cumarins mit Ausnahme der Hydrocumarsäure die narkotischen Eigenschaften des Cumarins mit geringen Unterschieden noch besitzen, jedoch keine nennenswerten Vorteile vor der Ausgangssubstanz bieten, besonders keinerlei Vorteile bieten durch geringere Giftigkeit im Verhältnis zur Wirksamkeit.

In S. Fränkels „Arzneimittelsynthese" findet sich das Cumarin unter der Bezeichnung „Substanzen, die vermöge ihrer CO-Gruppe narkotisch wirken". Unsere Versuche sprechen gegen die Berechtigung dieser Klassifizierung; denn nach Reduktion der CO-Gruppe des Cumarins zu CH_2 besitzt das entstandene Produkt noch dieselben narkotischen Eigenschaften. Der Vergleich von Hydrocumarsäure mit Melilotol spricht dagegen für eine Bedeutung des Lactonrings für das Zustandekommen der narkotischen Wirkung. Doch auch diese Verallgemeinerung stößt schon bei der niedereren Reduktionsstufe auf Schwierigkeiten.

Wir haben das Cumarin auch nach dem Verfahren von Skita der Reduktion (Hydrierung) mit Wasserstoff bei Gegenwart von kolloidalem Platin unterworfen und dabei eine Säure mit narkotischen Eigenschaften erhalten. Diese Versuche sind jedoch noch nicht abgeschlossen.

Digitized by Google

Über die Konservierung von Blut.

Von

Carl Oppenheimer.

(Aus dem chemischen Laboratorium der G. A. Krause & Co., A.-G., München.)

(Eingegangen am 21. Februar 1920.)

Über die Konservierung von Blut zum Zwecke der menschlichen Ernährung hat vor einigen Jahren E. Salkowski[1]) eine umfassende Arbeit publiziert, aus der hervorging, daß ein wirklich für die Praxis brauchbares Mittel noch nicht gefunden ist.

Salkowski fand, daß man zwar flüssiges Blut mit Hilfe von Borsäure und Salicylsäure eine Zeit lang erhalten kann. Er führt aber mit Recht aus, daß man das so flüssig erhaltene konservierte Blut vor der Benutzung erst koagulieren muß. Dann bleiben die zugesetzten Konservierungsstoffe in der Flüssigkeit und werden damit unschädlich gemacht, da nur das koagulierte Blutpulver nach entsprechender Auswaschung Verwendung findet. Umgekehrt gibt er an, daß auch bereits koaguliertes Blut mit Formalin eine Zeitlang erhalten bleiben kann, daß es dann aber schwierig ist, aus dem Blutkuchen das Formalin restlos zu entfernen.

Alle diese Verfahren der Konservierung, die im Grunde darauf hinauslaufen, daß man das Konservierungsmittel vor der Benutzung des Blutes wieder auswäscht, hatten für unsere speziellen Zwecke kein Interesse.

Für uns handelt es sich darum, ein Konservierungsmittel ausfindig zu machen, welches das Blut eine Zeitlang vor Fäulnis schützt, dann aber nicht entfernt zu werden braucht. Denn in unserem Plan lag es, das Blut, so wie es ist, ohne jede weitere Manipulation nach unserem Zerstäubungsverfahren zu trocknen.

---

[1]) E. Salkowski, diese Zeitschr. 71, 365. 1915.

Digitized by Google

Wir mußten also entweder ein Konservierungsmittel finden, das unschädlich ist und in dem Blutpulver erhalten bleiben kann, oder ein solches, das sich automatisch durch die Zerstäubungstrocknung selbst beseitigt.

Auf den ersten Blick mag es überflüssig erscheinen, daß wir überhaupt nach einem Konservierungsmittel geforscht haben, da wir ja das beste aller Konservierungsverfahren, eben die Trocknung, anwenden. Indessen liegen die Verhältnisse doch nicht so einfach, und der Wunsch, ein in diesem Sinne geeignetes Konservierungsmittel zu finden, hängt eng mit der Frage der ausgiebigen Überführung des Krauseschen Zerstäubungsverfahrens in den Großbetrieb zusammen.

Es ist natürlich für die Trocknung von Blut in großem Maßstabe, wenn das Trockenblut zur menschlichen Ernährung bestimmt sein soll, unbedingt notwendig, das Blut frei von Fäulnis bis zu dem Orte der Trocknung zu bringen. Das Ideal wäre, die Trockenanlage unmittelbar auf den Schlachthöfen zu errichten und das Blut in völlig frischem Zustande zur Trocknung zu bringen, so daß man überhaupt keines chemischen Konservierungsmittels bedürfte. Indessen kann man sich in der Praxis nicht darauf beschränken.

Das Krause-Verfahren kann seine wirtschaftlichen Erfolge nur dann in vollem Umfange erzielen, wenn die Betriebskosten durch den Bau von ziemlich großen Anlagen herabgesetzt werden können. Dabei wird sich als Normaltyp zugrunde legen lassen eine Anlage mit einer Leistungsfähigkeit von etwa 500 kg Wasserverdunstung für die Arbeitsstunde. Derartige Anlagen aber, die also eine Tagesleistung von 4—5000 l Blut haben, sind für die allermeisten Schlachthöfe insofern zu groß, als sie nicht voll bedient werden können. Bei der Überführung des Verfahrens in den Großbetrieb wird man also dazu schreiten müssen, auch das Blut benachbarter Gemeinden zu der Trocknung heranzuziehen (vgl. Opel)[1]. Sobald man aber mit Transporten und Umladungen zu rechnen hat, wird es, zum mindesten für die wärmeren Monate, unbedingt nötig sein, das Blut vor Fäulnis zu schützen.

Die bisher dazu angewendeten Verfahren sind in der Hauptsache die Konservierung mit 5—10% Kochsalz und mit Formalin. Beide haben ihre Bedenken. Das stark kochsalzhaltige Blut (25—50% der Trockensubstanz!) ist nicht mehr für alle wirtschaftlichen Zwecke verwendbar, da die daraus hergestellten Präparate leicht einen allzu starken Salzgeschmack annehmen;

---

[1]) Opel, Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhygiene 1919, H. 11—13.

Digitized by Google

das Formalin andererseits ist in der notwendigen Konzentration doch nicht gänzlich hygienisch unbedenklich und außerdem für die Konservierung großer Blutmengen zu teuer.

Unter diesen Umständen haben wir es für angebracht gehalten, uns nach einem weiteren Konservierungsmittel umzusehen, das sich speziell für den Transport von Blut zu den Trockenapparaten und für die Zerstäubung eignet.

Wir versuchten es zunächst mit flüchtigen organischen Konservierungsmitteln in der Hoffnung, daß diese bei der intensiven Zerstäubung und Trocknung in warmer Luft vollkommen flüchtig gehen und in dem fertigen Trockenpulver überhaupt nicht wieder aufzufinden sein könnten. Diese Hoffnung hat sich indessen nicht erfüllt. Sowohl Chloroform, wie auch Toluol und Senföl blieben hartnäckig an den getrockneten Pulvern adsorbiert und machten sie für den menschlichen Genuß minder tauglich, da die Pulver danach rochen und schmeckten. Erst nach sehr langer Zeit erwiesen sich die mit Chloroform behandelten Trockenpräparate als geruchs- und geschmacksfrei.

Dagegen erzielten wir sehr günstige Resultate mit der Verwendung von schwefliger Säure. Das freie SO^3-Ion ist ja längst als ein sehr wirksames Antiseptikum bekannt.

Daß es in den notwendigen geringfügigen Mengen nicht nachweisbar toxisch wird, und deshalb hygienisch einwandfrei ist, haben ja die ausgedehnten Arbeiten von E. Rost[1]) erwiesen. Man darf dabei ja nicht vergessen, daß es sich bei dem Konsum von Trockenblut in Form von Blutspeisen, Würsten u. dgl. immer nur um sehr geringe absolute Mengen handelt. Dementsprechend sind also auch die Mengen an schwefliger Säure, die aufgenommen werden, so geringfügig, daß an eine toxische Wirkung nicht zu denken ist.

Es kommt hinzu, daß bei unseren Versuchen die oben erwähnte Hoffnung, daß ein Teil des Konservierungsmittels sich beim Trockenprozeß selbst verflüchtigen oder in einen hygienisch völlig einwandfreien Stoff umwandelt, tatsächlich zum Teil erfüllt worden ist.

Es geht nämlich ein erheblicher Teil des Sulfitions während des Stehenlassens des Blutes in Sulfation über. Um ein Beispiel zu geben, fanden wir in einem Blutpulver, dessen Rohmaterial

[1]) E. Rost, Arb. aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt 1912. Bd. 43, Heft 2.

Digitized by Google

sich vorher als schwefelsäurefrei erwiesen hatte und mit 1‰ Sulfition (als SO_2 berechnet) konserviert war, entsprechend einer Menge von 0,5% SO_2 in der Trockensubstanz, im Pulver noch einen Gehalt von 0,15% SO_2, daneben aber 0,48% H_2SO_4. Dies ist entstanden aus 0,32% SO_2; und dies ergänzt sich tatsächlich mit dem noch aufgefundenen 0,15% SO_2 zu der Menge von 0,47% SO_2 gegenüber 0,5 zugesetzter Menge. Wir haben also innerhalb der Fehlergrenze das zugesetzte SO_3'' teils als SO_2, teils als Schwefelsäure wiedergefunden. Diese Veränderung scheint zum mindesten in der Hauptsache bereits beim Stehen des Blutes vor sich zu gehen; denn es enthielt das untersuchte Blut unmittelbar vor der Trocknung 0,15% SO_2 auf Trockensubstanz berechnet, so daß ein weiterer Verlust an SO_3'' während der Zerstäubung und Trocknung nicht eingetreten zu sein scheint. Nach diesem Resultat sind also etwa 70% der schwefligen Säure zu Schwefelsäure oxydiert und damit völlig unschädlich geworden.

Jedenfalls darf man wohl annehmen, daß die geringen Mengen schwefliger Säure, die in den fertigen Trockenprodukten noch vorhanden sind, keinen hygienischen Bedenken mehr unterliegen, so daß man das Verfahren wohl für die Praxis empfehlen kann. Allerdings ist bisher die Verwendung von schwefliger Säure für Fleisch und fleischähnliche Rohstoffe, zu denen ja auch Blut gehört, in Deutschland gesetzlich verboten. Es dürfte aber wohl keinen Schwierigkeiten unterliegen, die leitenden Behörden davon zu überzeugen, daß dieses Verbot, soweit es die Verwendung von schwefliger Säure für Blut anlangt, unbedenklich aufgehoben werden kann. Es ist ja auch das Verbot für Fleisch nicht oder wenigstens nicht vorwiegend wegen der Gefahr einer Vergiftung mit schwefliger Säure erfolgt, sondern weil die Verwendung von schwefligsauren Salzen bei Fleisch die Gefahr einer Täuschung herbeiführt, insofern als man notorisch verdorbenes und gesundheitsschädliches Fleisch durch die Behandlung mit schwefliger Säure wieder so herrichten kann, daß sein gefährlicher Zustand nicht mehr offensichtlich ist. Dieser Umstand kommt aber für Blut nicht in Betracht, da man deutlich verdorbenes Blut auch mit schwefliger Säure nicht wieder genußfähig machen kann. Es wäre also sehr wünschenswert, wenn die maßgebenden Faktoren zu einer Nachprüfung dieser gesetzlichen Beschränkungen, evtl. zu ihrer Aufhebung schreiten würden.

Digitized by Google

Denn das Verfahren der Konservierung mit schwefliger Säure leistet tatsächlich alles, was man von einem Konservierungsmittel verlangen kann. In einer Konzentration von 2°/₀₀ auf SO_2 berechnet, hält es Blut auch bei hohen Temperaturen ohne jede Veränderung frisch. Auch eine Farbenveränderung in dem Sinne, daß das Trockenblut weniger ansehnlich würde, tritt nicht auf, ebenso wenig ist die durch das Krausé-Verfahren bedingte völlige Wiederlöslichkeit des Trockenpulvers irgendwie beeinträchtigt.

Es sei ferner noch erwähnt, daß es keinen Unterschied macht, ob man defibriniertes oder geronnenes und durch einfache Zerkleinerungsmethoden wieder zerteiltes Blut konserviert. Diese Feststellung ist insofern wichtig, als das Krause-Verfahren im Gegensatz zu den bisher gelegentlich angewendeten Bluttrocknungsmethoden es ermöglicht, auch das undefibrinierte Blut nach der Gerinnung und Zerkleinerung (z. B. in einem einfachen Kutter oder einer geeigneten Mühle) zu einem durchaus homogenen und brauchbaren Pulver zu zerstäuben.

An sich also erscheint, wenn wir von den gesetzlichen Beschränkungen absehen, die Frage der Konservierung von Blut bis zum Moment der Trocknung gelöst. Es bedarf keiner Betonung, wie wichtig für unsere Volksernährung die Möglichkeit ist, sich von der unmittelbar erfolgenden Trocknung des ganz frischen Blutes auf den Schlachthöfen in weitgehendem Maße zu emanzipieren und auch älteres und von anderen Stellen her transportiertes Blut zu verarbeiten. In der wärmeren Jahreszeit wird schon auf den Schlachthöfen selbst unter Umständen eine Konservierung sehr erwünscht sein, wenn man größere Quantitäten des geronnenen Blutes aufsammeln will, ehe man sie trocknet, weil darüber immerhin schon einige Stunden vergehen werden. Viel wichtiger ist natürlich die Möglichkeit, Blut aus den verschiedensten Quellen zu sammeln und zu dem gemeinsamen Trockenapparat zu transportieren. Von ganz besonderer Wichtigkeit aber könnte die Möglichkeit der Blutkonservierung in Verbindung mit dem Krause-Verfahren dann werden, wenn wir mit der Möglichkeit rechnen, aus den überseeischen Ländern mit ausgedehnten Schlachtbetrieben Trockenblut in großem Maßstabe einzuführen. Das Blut hat dort vielfach kaum einen Materialwert, und wir könnten aller Voraussicht nach in diesem eingeführten

Digitized by Google

Blut große Mengen eines außerordentlich wertvollen und billigen Eiweißträgers für unsere Volksernährung gewinnen.

An sich ist das Trockenblut jahrelang unter allen Bedingungen völlig unverändert haltbar, die Schwierigkeit in den tropischen und subtropischen Ländern liegt eben nur darin, es vor der Trocknung in völlig einwandfreiem Zustande zu erhalten, und diese Schwierigkeit scheint uns durch die Anwendung der schwefligen Säure gelöst zu sein.

Das Verfahren hat weiterhin den Vorteil, daß es sehr bequem und sehr billig ist. Wir verwenden das käufliche reinste Natriumsulfit von der Zusammensetzung $Na_2SO_3 \cdot 7\,H_2O$, oder das wasserfreie Natriumsulfit. Von diesem Material wird die notwendige Menge in etwas Wasser gelöst, unmittelbar vor dem Zusetzen zum Blut mit der berechneten Menge Salzsäure oder Schwefelsäure versetzt, um das SO_3-Ion freizumachen, und dann durch kurzes Umrühren mit dem Blute vermischt. Die notwendige Menge wird in der Regel 2‰ betragen; für kürzere Transporte bei kühlerer Temperatur wird nach den Resultaten der unten wiedergegebenen Tabelle auch 1‰ genügen, 3‰ reichen für lange Wege bei hoher Sommertemperatur aus.

Der Zusatz von Säuren, um die schweflige Säure freizumachen, ist unbedingt notwendig, denn das Natriumsulfit ohne diesen Zusatz hat, wenigstens bei Blut, eine außerordentlich geringe konservierende Kraft.

Aus rein praktischen Gründen haben wir noch einige andere Säuren zum Freimachen der schwefligen Säure herangezogen, nämlich Oxalsäure und Weinsäure, und gefunden, daß bei Verwendung der berechneten Menge das Resultat genau dasselbe ist. Im allgemeinen wird die Verwendung dieser Säuren kaum einen Zweck haben, wir haben sie aber doch feststellen wollen, weil unter folgenden Umständen ihre Verwendung in Betracht kommen könnte: wo man damit rechnen muß, die Konservierung durch völlig unkundiges Schlachthofpersonal vornehmen zu lassen, ist es vielleicht aus rein praktischen Gründen zweckmäßiger, außer dem festen schwefligsauren Natrium auch die zuzusetzende Säure in fester Form zu verwenden, um Mißgriffe mit der Abmessung der flüssigen Salzsäure oder Schwefelsäure zu vermeiden. Man kann dann einfach die notwendige Menge beider Reagentien „für ein Pferd", „für ein Rind" abgewogen fertighalten und dem

Digitized by Google

Schlachthofpersonal den Auftrag geben, für jede Schlachtung den Inhalt beider Papierdüten oder Gläschen dem Blute zuzusetzen und durchzurühren.

Das Rezept für die Herstellung des Konservierungsmittels geben wir anbei noch einmal kurz zusammengefaßt wieder, und zwar berechnet auf 10 l Blut, also für ein Rind:

Man löse ca. 83 g käufliches reinstes Natriumsulfit, resp. ca. 40 g wasserfreies Natriumsulfit in ½—1 l Wasser und füge an Säure hinzu: von Salzsäure 38%: ca. 52 ccm, von Schwefelsäure konz.: 18,2 ccm, von Weinsäure: 49,3 g, von Oxalsäure: 41,4 g.

Wir geben zum Schlusse noch die tabellarische Aufstellung unserer Versuche, aus denen alle Einzelheiten ersichtlich sein werden.

Beispiele von Konservierungsversuchen mit schwefliger Säure an frischem Rinderblut.

Das Blut wurde am Schlachtungstag selbst (21. III. 1918) konserviert.

I. Bei gewöhnlicher Zimmertemperatur:

	23. III.	25. III.	26. III.	27. III.	28 III.
0‰	Spur Fäulnis	Beginnende Fäulnis	gefault		
½‰	H_2S-Geruch	Kein H_2S-Geruch; verdächtig	gefault		
1‰	Schw. H_2S-Geruch	H_2S-Geruch; verdächtig	Beginnende Fäuln.	gefault	
2‰	gut	gut	gut	gut	Spur-verdächt.
3‰	gut	gut	gut	gut	gut

Die Probe mit 2‰ war am 2. IV. gefault.

Die Probe mit 3‰ wurde am 14. IV. fortgetan, sie war noch nicht gefault.

II. Bei 30° im Thermostaten:

	23. III.	25. III.	26. III.	27. III.	28. III.
0‰	gefault				
½‰	gefault	gefault			
1‰	Beginnende Fäulnis	gefault			
2‰	gut	gut	gut	Spur verdcht.	Spur verdcht.
3‰	gut	gut	gut	gut	gut

Die Probe mit 2‰ war am 2. IV. gefault.

Die Probe mit 3‰ wurde am 18. IV. fortgetan, sie war noch nicht gefault.

Digitized by Google

Konservierungsversuche von defibriniertem Blut mit gebundener SO_2 (Na_2SO_3 ohne Säurezusatz)

bei Zimmertemperatur, angesetzt am 15. I. 1919:

	16. I.	17. I.	18. I.
0‰	gut	gefault	—
½‰	schwacher Fäulnisgeruch	stark H_2S	gefault
1‰	schwacher Fäulnisgeruch	H_2S	gefault
2‰	schwacher Fäulnisgeruch	H_2S weniger	gefault
3‰	ganz schwacher Fäulnisgeruch	H_2S schwach	gefault

im Brutschrank, angesetzt am 15. I. 1919:

	16. I.
0‰	gefault
½‰	gefault
1‰	gefault
2‰	gefault
3‰	gefault

bei Zimmertemperatur, angesetzt am 17. VI. 1919:

	18. VI.	20. VI.
0‰	beg. Fäulnis	faul
1‰	gut	faul
2‰	gut	faul
3‰	gut	faul
4‰	gut	faul
5‰	gut	faul

im Brutschrank, angesetzt am 17. VI. 1919:

	18. VI.
0‰	gefault
1‰	gefault
2‰	gelauft
3‰	gefault
4‰	gefault
5‰	gefault

Konservierungsversuche von defibriniertem Blut mit freier schwefliger Säure (Na_2SO_3 mit der äquivalenten Menge Oxalsäure versetzt).

bei Zimmertemperatur, angesetzt am 17. VI. 1919:

	18. VI.	20. VI.	21. VI.	26. VI.	24. VI.	25. VI.
0‰	beg. Fäulnis	gefault				
1‰	kein Blutgeruch	beg. Fäulnis				
2‰	kein Blutgeruch	gut	gut	gut	gut	gut
3‰	kein Blutgeruch	gut	gut	gut	gut	gut
4‰	gut	gut	gut	gut	gut	gut

Digitized by Google

Konservierungsversuche von defibriniertem Blut mit freier schwefliger Säure (Na_2SO_3 mit der äquivalenten Menge Weinsäure versetzt).

1. Zimmertemperatur 15°, angesetzt am 17. VI. 1919:

	18. VI.	20. VI.	21. VI.	23. VI.	24. VI.	25. VI.
1‰	Spur faul	gefault				
2‰	gut, braun gefärbt	gut	gut	beg. Fäulnis	beg. Fäulnis	beg. Fäulnis
3‰	gut, stark abgesetzt	gut	gut	gut	gut	gut
4‰	gut, stark abgesetzt	gut	gut	gut	gut	gut
5‰	gut, stark abgesetzt	gut	gut	gut	gut	gut

2. im Brutschrank 30 , angesetzt 17. VI. 1919:

	18. VI.	20. VI.	21. VI.	23. VI.	24. VI.	25. VI.
0‰	gefault					
1‰	gefault					
2‰	Spur F.	Spur F.	Spur	verschimmelt Spur		
3‰	gut	gut	gut	Spur	beg. Fäulnis	beg. Fäulnis
4‰	gut, dicklich	gut	gut	Spur	do.	do.
5‰	gut, Gallerte	gut	gut	Spur	do.	do.

Konservierungsversuche von Fibrinblut (Blutkuchen wurde möglichst fein zerkleinert und wieder mit dem Serum vereinigt) mit freier schwefliger Säure (Na_2SO_3 mit der äquivalenten Menge Salzsäure versetzt).

1. Zimmertemperatur 15°. angesetzt am 23. V. 1919:

	24. V.	26. V.	27. V.	28. V.	30. V.	31. V.
0‰	gut	gefault				
1‰	gut	gefault				
2‰	gut	gut	gut	gut	gut	unverändert weggeworfen
3‰	gut, bräunlich verfärbt	gut	gut	gut	gut	unverändert weggeworfen
4‰	gut, bräunlich verfärbt	gut	gut	gut	gut	unverändert weggeworfen
5‰	gut, bräunlich verfärbt	gut	gut	gut	Spur Fäulnis	unverändert weggeworfen

im Brutschrank 30°, angesetzt am 23. V. 1919:

	24. V.	26. V.	27. V.	28. V.	29. V.	31. V.
0‰	Beginnende Fäulnis	gefault				
1‰	Beginnende Fäulnis	gefault				
2‰	gut	gut	beg. Fäulnis	gefault		unverändert weggeworfen
3‰	gut	gut	Spur Fäulnis	Spur Fäulnis	Spur Fäulnis	unverändert weggeworfen
4‰	gut, braun, dicklich	Spur Fäulnis gestockt	Spur Fäulnis	Spur Fäulnis	Fäulnis	unverändert weggeworfen
5‰	gut, braun, dicklich	gut, gestockt	Spur Fäulnis	beginn. Fäulnis	Spur Fäulnis	unverändert weggeworfen

Digitized by Google

Konservierungsversuche von Fibrinblut (Vorbehandlung siehe oben) 1:1 mit Wasser verdünnt, mit freier schwefliger Säure (Na_2SO_3 mit der äquivalenten Menge Salzsäure versetzt).

1. Zimmertemperatur 15°, angesetzt am 17. VI. 1919:

	18. VI.	20. VI.	21. VI.	23. VI.	24. VI.	25. VI.
0°/oo	beginnende Fäulnis	gefault				
1°/oo	gut	gefault				
2°/oo	gut	gut	gut	Spur Fäulnis	Spur	Spur
3°/oo	gut	gut	gut	gut	gut	gut
4°/oo	gut gallertig	gut	gut	gut	gut	gut
5°/oo	gallertig	gut	gut	gut	gut	gut

im Brutschrank 30°, angesetzt 17. VI. 1919:

	18. VI.	20. VI.	21. VI.	23. VI.	24. VI.	25. VI.
0°/oo	gefault					
1°/oo	gefault					
2°/oo	beginnende Fäulnis					
3°/oo	Spur Fäulnis, gallertig	Spur Fäulnis	Spur Fäulnis	Spur	Spur	beginn. Fäulnis
4°/oo	Spur Fäulnis gallertig	do.	do.	Spur	Spur	do.
5°/oo	Spur Fäulnis gallertig	do.	do.	Spur	Spur	do.

Meiner Mitarbeiterin, Frl. Beatrix Osborne, danke ich für ihre eifrige und verständnisvolle Beteiligung an der Arbeit.

Digitized by Google

Beitrag zum Mechanismus der Pepsinwirkung.

Von

A. Gyemant.

(Aus dem biologischen Laboratorium des städt. Krankenhauses am Urban.)

(Eingegangen am 24. Februar 1920.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

1.

In der Frage, worauf der Einfluß der Säure bei der Pepsinverdauung beruhe, bestehen noch gewisse Meinungsverschiedenheiten. Michaelis hat die Theorie aufgestellt, daß die Fermente Elektrolyte seien, die nach dem Massenwirkungsgesetz dissoziieren. Ihr Zustand wird also genau von der Wasserstoffionenkonzentration geregelt. Nimmt man nun an, daß von den möglichen Existenzformen des Ferments: Anion, Kation, ungeladenes Molekül, nur eine die fermentative Wirkung ausübt, so ist der Zusammenhang zwischen dieser Wirkung und der Wasserstoffzahl geklärt. Es wird durch Variierung der h das Verhältnis zwischen dem wirksamen Anteil und der Gesamtmenge des Ferments geändert und die Wirksamkeit geht diesem Verhältnis parallel. Die Berechtigung dieser Annahme wurde am genauesten bei der Invertase bewiesen. Hier konnte man die Abhängigkeit der Wirkung von der Wasserstoffzahl am besten so erklären, daß das Ferment ein Ampholyt sei und die Wirkung dem undissoziierten Anteil zukäme.

Nun wurde versucht, diese Anschauung auch auf andere Fermente, so auch auf das Pepsin zu übertragen. Das Optimum der Wirkung wurde sowohl von Sörensen[1]) wie Michaelis und Davidsohn[2]) bei ungefähr $p_H = 1{,}8$ gefunden. Da nun Überführungsversuche ergaben, daß das Pepsin

[1]) Sörensen, Enzymstudien II. Diese Zeitschr. **21**, 131. 1909.

[2]) Michaelis und Davidsohn, Die Bedeutung und Messung der Magensaftazidität. Zeitschr. f. experim. Path. u. Ther. 8. 1910.

Digitized by Google

bei dieser Wasserstoffzahl kathodisch ist, mußte, da mit steigender Ansäuerung vom Neutralpunkt aus, die Wirkung zunimmt, den Pepsin kationen die proteolytische Wirkung zugeschrieben werden. Daß die Verdauung mit steigender Acidität dann durch ein Maximum ging, wurde mit der Hilfshypothese erklärt, daß bei noch höheren Säuregraden das Pepsinmolekül ein zweiwertiges Kation wird, welches unwirksam sei.

Dieser Anschauung gegenüber entstand nun eine andere Theorie, welche hauptsächlich von W. Ringer[1]), Christiansen[2]) und J. Traube[3]) vertreten wird. Danach sollte die Säure eigentlich nur die Rolle eines Quellungsmittels spielen, das die Eiweißkörper den Fermenten durch die Quellung zugänglich macht. Mehrere Versuche ergaben, daß sich das Verdauungsoptimum mit dem Quellungsoptimum tatsächlich deckte. Besonders die Arbeiten von Ringer haben dargetan, daß

1. verschiedene Säuren in verschiedenem Maße die Fähigkeit besitzen, das Pepsin zu aktivieren, und zwar daß diese Fähigkeit um so stärker ist, je weniger hydrophil die Anionen der Säure sind;

2. daß sie sogar das Optimum verschieben können, und zwar in der Richtung, in der die Quellung stärker wird.

Michaelis hatte nun an möglichst homogen gelösten Eiweißkörpern, Ringer anfänglich nur mit koaguliertem, festem Eiweiß gearbeitet. Als nun aber Ringer[4]) seine Versuche nicht nur mit festen, sondern auch mit gelösten Eiweißkörpern anstellte, ergab sich, daß eine Parallelität zwischen Verdauung und Quellung nicht mehr bestand. Er modifizierte seine Ansicht also dahin, daß die Quellung des Substrats nur dann von Belang ist, wenn das Substrat fest ist, oder — falls es flüssig ist — nur im Beginn der Verdauung, weil dann die Partikel noch so groß sind, daß eine Quellung die Oberfläche bedeutend vermehren kann, was später nicht mehr der Fall ist. Wie also ersichtlich, ist die Bedeutung der Quellungstheorie von Ringer selbst bedeutend eingeschränkt worden, da er z. B. angibt, daß im Beginn der Verdauung, wo dieser Einfluß noch bemerkbar ist, nur $^1/_{60}$ des Verdauungswertes, den er am Ende seiner Versuche beobachtete, zu finden war.

Bevor wir mit der Klärung des Problems weitergingen, mußte zuerst dieser Punkt berücksichtigt werden. Bei festen Eiweißklumpen mag ja die Quellung eine gewisse Rolle spielen, das soll nicht geleugnet werden, und für die praktische Physiologie ist diese Feststellung von Wert. Es ist sicher, daß man das Substrat bei der Verdauung berücksichtigen muß und daß dessen

[1]) Ringer, Studien am Pekelharingschen Pepsin. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chemie 95. 1915.

[2]) Christiansen, Beiträge zum Mechanismus der Pepsinverdauung. Diese Zeitschr. 47. 1912.

[3]) J. Traube, Dtsch. med. Wochenschr. 1919. Nr. 27. Vgl. dazu L. Michaelis, ibid. 1920. Nr. 5.

[4]) Ringer, Die Bedeutung des Zustandes des Substrats bei der Pepsinverdauung. III. Mitt. Kolloid-Zeitschr. 19. 1916.

Digitized by Google

Quellungszustand in Fällen, wo wir es mit zwei „grob" getrennten Phasen zu tun haben, von Bedeutung ist. Wie weit indessen dieser Einfluß der Säuren den anderen, nämlich den Einfluß auf den Dissoziationszustand des Ferments zu verdecken vermag, das sollte nun in folgenden Versuchen festgestellt werden.

Im allgemeinen liegt die Sache bei der Salzsäure so, daß das „Eiweißchlorid" ein stark dissoziierter Elektrolyt ist, daß also mit steigender Ansäuerung bis zu ziemlich hoher Azidität die Menge der Eiweißionen und die Quellung zunehmen muß. Dies ist jedoch keineswegs immer der Fall. Im Gegenteil, wir konnten zwei Kombinationen zusammenstellen, wo die Säure das Eiweiß nicht zur Quellung, sondern zur Fällung bringt. Ein ausgesprochenes Beispiel hierfür ist die Sulfosalicylsäure. Wenn man z. B. Serumeiweiß damit ansäuert, entsteht zunächst eine milchige Trübung, die aber mit Steigerung der Säuremenge immer dicker und dicker wird, so daß das Eiweiß schließlich in Flocken ausfällt. Bei $p_H = 2$ ist dieser Zustand bei 0,5% Eiweißgehalt längst erreicht. Ganz ähnlich verhält es sich bei der Kombination Ricinglobulin + HCl, welche die Grundlage des Pepsinnachweises von M. Jacoby bildet. Das Ricin, in ClNa-Lösung gelöst, hat ein Säurefällungsoptimum gerade in der Nähe von $p_H = 2$. Es stellte sich nun bei Verdauungsversuchen, die mit diesen beiden Gemischen angestellt worden sind, heraus, daß das Optimum der Verdauung bei genau derselben Azidität liegt, wie es auch sonst zu finden ist, nämlich bei $p_H =$ etwa 1,7 bis 2. Hier hatten wir also ausgesprochen heterogene Systeme, wo Abweichungen von demjenigen Dissoziationszustand, wie er aus dem Massenwirkungsgesetz berechnet werden kann, sogar zu erwarten waren. Und dennoch fiel das Optimum genau dorthin, wo es mit gelöstem Eiweiß liegt. Wäre der Quellungszustand von irgend einem Einfluß, so hätte man mindestens eine Verschiebung nach der alkalischen Seite antreffen müssen. Ja, wir können sogar sagen, daß, wenn die Quellungstheorie richtig ist, dann die Sulfosalicylsäure das Pepsin überhaupt nicht aktivieren könnte, da sie ja unter keinen Umständen das Eiweiß durch Quellung vorbereiten, sondern immer nur fällen kann.

Was nun die Einzelheiten der Versuche betrifft, wurden sie folgendermaßen ausgeführt.

Digitized by Google

Versuch I.

Ausgegangen wurde von genuinem Menschenblutserum, und zwar in der Verdünnung 1 : 10. Die gebrauchte Sulfosalicylsäure war 20 prozentig, die Pepsinlösung 1 proz. (Pepsin Grübler). Es wurden nun folgende Gemische hergestellt.

	1. ccm	2. ccm	3. ccm	4. ccm	5. ccm	6. ccm
Verdünntes Serum	12	12	12	12	12	12
Sulfosalicylsäure	0,2	0,5	0,7	1	1,5	0
H_2O	1,8	1,5	1,3	1	0,5	2
Pepsinlösung	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6

Aus jedem wurden 10 ccm entnommen zur elektrometrischen Bestimmung der Wasserstoffzahl. Der Rest wurde ins Wasserbad von 37° gestellt und darin unter öfterem Umschütteln 1 Stunde belassen. Zu 4,6 ccm des Gefäßes Nr. 6 wurden hingegen sofort nach Pepsinzusatz 3 ccm Sulfosalicylsäure gesetzt und in 2 ccm des Filtrats der Stickstoff mit der Mikrokjeldahl-Methode bestimmt. Dadurch ergab sich die Menge des durch Sulfosalicylsäure überhaupt nicht fällbaren Stickstoffs, also gewissermaßen der Nullpunkt der Reihe. Dieser Wert (0,14 mg) wurde von den übrigen abgezogen. Ferner wurde in einem der Gemische der Gesamtstickstoff bestimmt und auf 2 ccm des Filtrats umgerechnet (0,8 mg). Nach der Verdauung wurde zur Ausfällung des Eiweißes und zur Unterbrechung der Verdauung in die Gefäße folgende Menge von Säure und Wasser gefügt:

	1. ccm	2. ccm	3. ccm	4. ccm	5. ccm
Sulfosalicylsäure	2,94	2,84	2,77	2,67	2,5
H_2O	0,06	0,16	0,23	0,33	0,5

Dadurch waren nun überall die gleichen Mengen von Säure vorhanden. Im Filtrat (2 ccm) war überall N bestimmt. Das Ergebnis der Serie war folgendes:

	1.	2.	3.	4.	5.
p_H	3,32	2,35	2,03	1,84	1,7
Verdauter N in mg	0,28	0,44	0,51	0,45	0,43

Gesamtstickstoff 0,8 mg. Pepsinkonzentration 0,4‰.

Wie ersichtlich, wurde der Fortschritt der Verdauung durch die Zunahme des durch Sulfosalicylsäure nicht fällbaren Stickstoffs bestimmt. Das Optimum liegt im 3. Gefäß bei p_H 2,03.

Zur Sicherung des Resultates wurde noch eine Serie gemacht, deren Zahlenangaben die folgenden sind:

Digitized by Google

Versuch II.

	1. ccm	2. ccm	3. ccm	4. ccm	5. ccm	Kontrolle
Serumverdünnung	12	12	12	12	12	12
Säure	0,4	0,5	0,7	0,8	0,9	—
H_2O	1	0,9	0,7	0,6	0,5	1,4
Pepsin	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6

Je 10 ccm entnommen zur Bestimmung der h. Zur Kontrolle sofort Säureüberschuß. Der Rest 1 Stunde bei 37°. Dann wurde zugefügt:

	1. ccm	2. ccm	3. ccm	4. ccm	5. ccm
Sulfosalicylsäure	2,9	2,8	2,8	2,7	2,7
H_2O	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3

Im Filtrat N bestimmt, Kontrollenwert abgezogen. Das Resultat war folgendes:

	1.	2.	3.	4.	5.
p_H	2,52	2,25	1,99	1,92	1,85
Verdauter N in mg	0,50	0,49	0,65	0,58	0,55

Gesamt-N 0,85 mg. Pepsinkonzentration 0,4 ‰.

Verdauungsoptimum bei $p_H = 1{,}99$, also vollkommene Übereinstimmung mit der ersten Reihe. Wir geben nun noch die Ergebnisse der beiden Reihen in Kurven aufgetragen:

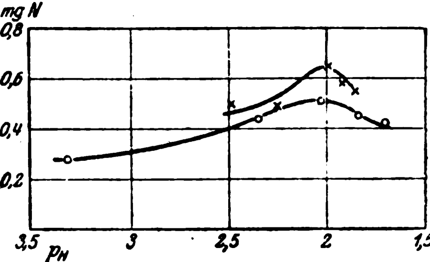


Abb. 1. ○ = 1. Versuch. × = 2. Versuch.

Um zu sehen, daß die Verdauung nach Zusatz der überschüssigen Sulfosalicylsäure tatsächlich zum Stillstand kam, haben wir noch folgenden Ergänzungsversuch gemacht. Es wurden folgende Gemische hergestellt:

	1. ccm	2. ccm	3. ccm
Reines Serum	1,5	1,5	1,5
20% Sulfosalicylsäure	7	7	7
n-NaOH	7,3	—	—
H_2O	0,2	7,5	7,5

Aus 3. wurden sofort 3 ccm abpipettiert, dazu 0,1 ccm Pepsin (1,3%) und 1,5 ccm H_2O gesetzt und in den Eisschrank gestellt. Zu 1. und 2. kamen je 0,5 ccm Pepsinlösung, darauf 1 Stunde lang Verdauung bei 37°; dann je

Digitized by Google

3 ccm entnommen, zu 1. kam 1,5 ccm Sulfosalicylsäure, zu 2. 1,5 ccm H_2O, worauf sie auch in den Eisschrank gestellt wurden. Am anderen Tag alle abfiltriert, vom Filtrat je 2 ccm zur N-Bestimmung verwendet. Darin waren in 1. ($p_H = 2{,}8$) 0,63 in 2. 0,27, in 3. 0,22 mg N. Also stimmen 2. und 3. bis auf die Fehlergrenzen überein, es wurde bei Säureüberschuß ebensoviel N gefunden im Filtrat, wie bei der Kontrolle ohne Verdauung, während in 1. 0,41 mg verdaut worden sind.

Im ganzen ergibt sich für die Versuche mit Sulfosalicylsäure: das Verdauungsoptimum ist etwa $p_H = 2{,}0$. Es ist nicht sehr scharf bestimmbar, wohl noch etwas unschärfer als für andere Säuren; aber $p_H = 3{,}3$ ist schon weit entfernt von der optimalen Wirksamkeit und andererseits gelingt es leicht, durch einen Überschuß der Säure die Verdauung ganz zu unterdrücken.

Versuch III.

Die Ricinglobulinlösung wurde folgendermaßen hergestellt. Es wurden 2 g Ricin (nach Jacoby), 10 g NaCl und 200 g H_2O unter öfterem Umrühren 24 Stunden bei Zimmertemperatur belassen, dann filtriert. Das Filtrat war leicht trübe. Davon je 20 ccm, ferner:

	1. ccm	2. ccm	3. ccm	4. ccm	5. ccm	6. ccm
n-HCl	0	0,1	0,2	0,5	1	2
H_2O	2	1,9	1,8	1,5	1	0
Pepsinlösung (1 proz.)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

1 Stunde bei 37°. Dann zu je 5 ccm.

	1. ccm	2. ccm	3. ccm	4. ccm	5. ccm	6. ccm
n-NaOH	0	0,02	0,04	0,1	0,2	0,4
H_2O	1	0,98	0,96	0,9	0,8	0,6
20 proz. Sulfosalicylsäure	1	1	1	1	1	1

Also überall gleichviel Menge von Säure. 24 Stunden im Eisschrank stehen gelassen, dann filtriert, je 5 ccm zu Kjeldahl verwendet. Ferner wurde aus einer dem Verdauungsgemisch ähnlich bereiteten Flüssigkeit das Eiweiß ohne Verdauung niedergeschlagen, im Filtrat N bestimmt und dieser Wert

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
p_H	4,73	3,58	2,6	1,76	1,37	1,06
Verdaute mg N	0	0,46	0,6	0,83	0,73	0,68

Digitized by Google

von allen übrigen abgezogen. p_H wurde hier nach der Verdauung bestimmt, im Gegensatz zu den zwei ersten Versuchen. Das macht aber, wie wir noch sehen werden, nicht viel aus.

Verdauungsoptimum bei $p_H = 1{,}76$, also etwa dort, wo das Flockungsoptimum liegt. In Kurvenform dargestellt:

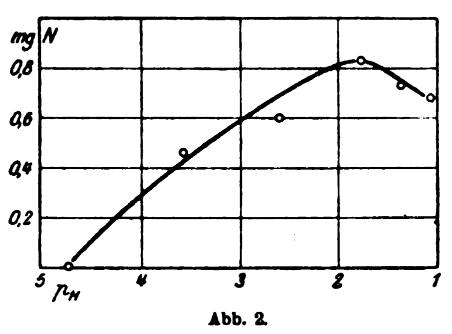


Abb. 2.

2.

Nun können wir weiter gehen und fragen: Falls wir die Quellungstheorie als ungenügend zur Erklärung des Pepsinoptimums betrachten können, bleibt dann nur die zu Anfang erwähnte Theorie übrig, oder sind auch noch andere Erklärungsmöglichkeiten vorhanden? Wir werden sofort sehen, daß zwar der Kern der Michaelisschen Theorie, nämlich der Einfluß der h auf den Dissoziationszustand aufrecht zu erhalten ist, daß hingegen die speziellen Aussagen über den Pepsinmechanismus verschiedene sein können. Und da müssen wir nun erstens auf folgendes hinweisen.

Es wurde bei der Fassung der zu Anfang geschilderten Theorie der Umstand unberücksichtigt gelassen, daß ja das Substrat der Pepsinverdauung ebenfalls ein Ampholyt ist, folglich, daß es ebenso dem Einfluß der Wasserstoffzahl unterliegt, wie das Ferment selbst. Bei der Invertasewirkung ist die Sache einfach, da Saccharose nur in einer Form vorkommt, von welcher h auch die Lösung sein mag. Der hypothetische Stoff, welcher durch Vereinigung des Ferments und des Substrats zustande kommt und wahrscheinlich bei jeder Fermentwirkung mit seiner Konzentration die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt, war hier leicht als Funktion der Menge der undissoziierten Invertasemoleküle berechenbar, wie das Michaelis[1]) auch durchgeführt hat. Beim Pepsin ist der Sachverhalt komplizierter. Es wird durch die h auch der Zustand des Eiweißes geändert.

Hier greift nun eine interessante Beobachtung von Pekel-

[1]) Michaelis, Zur Theorie der elektrolytischen Dissoziation der Fermente. Diese Zeitschr. 60. 1914.

Digitized by Google

haring und Ringer[1]) ein, die wir als richtig annehmen dürfen, wenn wir auch leider zur Zeit nicht die Möglichkeit haben, sie nachzuuntersuchen. Sie arbeiteten nämlich mit einem Pepsinpräparat, das nach Pekelharing aus Hundemagensaft hergestellt wird und sich durch besondere Reinheit auszeichnet. Sie fanden nun, daß dieses Pepsin immer anodisch wandert, mochten sie die Lösung noch so stark ansäuern. Das reine Pepsin muß also tatsächlich als Säure und nicht als Ampholyt mit meßbar großem Basencharakter aufgefaßt werden. Und zwar als eine recht starke Säure, denn eine schwache sollte ja doch schon von etwa $^{n}/_{100}$-HCl ganz entladen werden. Ringer beobachtete aber erst bei $^{n}/_{10}$-Lösungen eine deutliche Abnahme der Wanderung. Wir dürfen hiernach für das Pepsin eine Dissoziationskonstante von der Größenordnung 10^{-1} vermuten. Wenn aber Ringer seinem Pepsin Eiweiß zufügte, so zeigte es das von Michaelis und Davidsohn beschriebene Verhalten, es wanderte in stark saurer Lösung kathodisch. Offenbar ist also der isoelektrische Punkt, den Michaelis und Davidsohn gefunden haben, nicht der des reinen Pepsins, sondern der einer Pepsin-Peptonverbindung. Eigentlich hätte man ja erwarten müssen, daß diese Verbindung elektrisch neutral ist, da aber die Eiweißkörper mehrere Basengruppen besitzen, so wird außer der an das Pepsin bindungsfähigen basischen Gruppe noch eine zweite, wahrscheinlich schwächer basische Gruppe, vorhanden sein, und die Verbindung verhält sich wie ein Ampholyt, dessen Ladung von der Wasserstoffzahl abhängig ist.

Unter dieser Annahme entwickelt sich nun das Bild der Pepsinverdauung folgendermaßen. Der Eiweißkörper wird durch steigende Säuremengen immer mehr als Kation dissoziieren. Und je mehr er das tut, umso mehr kann sich das Eiweiß mit dem negativen Pepsinanion vereinigen. Die Verdauung wird mit steigender Azidität immer intensiver. Dies ist eine Auffassung, die sich neuerdings auch bei Northrop[2]) geltend macht und auch Ringer in den neueren Arbeiten für gelöste Eiweißkörper vertritt. Nur beharrt er dabei bei der Ansicht, dem Zustand des Ferments

---

1) Pekelharing und Ringer, Zur elektrischen Überführung des Pepsins. Zeitschr. f. physiol. Chemie 75. 1911.

2) Northrop, The combination of enzyme and substrate. Journ. of general physiology 2. 1919.

Digitized by Google

ginge jede besondere Bedeutung ab. Und hier gehen unsere Ansichten wieder auseinander. Wenn wir nämlich die Frage stellen, warum bei steigender Azidität die Wirkung des Pepsins wieder abnimmt, so sehen wir, daß jetzt eigentlich die Anschauung von Michaelis, welche vom Dissoziationszustand des Ferments ausging, in ihre Rechte tritt. Es ist ja klar, daß, wenn auch das Pepsin als verhältnismäßig starke Säure zu betrachten ist, so seine Dissoziation durch $p_H < 2$ doch allmählich zurückgedrängt wird, wie dies auch aus Ringers Kataphoresebefunden hervorgeht. Und deswegen muß auch die Konzentration der intermediären Pepsineiweißverbindung bei Verminderung von p_H schließlich wieder sinken.

Demgegenüber behauptet Ringer, daß dieser Rückgang der Verdauung bei Überschreitung des Säureoptimums auch vom Substrat herrühre, und zwar beruhe er auf einer Zurückdrängung der positiven Ladung des Eiweißes durch den Überschuß der Cl-Ionen. Dadurch vermehre sich die Oberflächenspannung der Eiweißpartikel, ihr Dispersitätsgrad müsse also wieder sinken[1]. Kurz, der absteigende Schenkel der Verdauungskurve sei durch die Anionen und nicht durch die h verursacht.

Daß dies nicht oder zum mindesten nicht allein so sein kann, bewiesen wir durch folgende Versuchsanordnung. Es wurde eine Eiweißlösung mit starkem Säuregehalt und daraus die verschiedenen h durch Versetzen mit NaOH hergestellt. Dadurch ist die Konzentration der Chloride überall die gleiche, es variiert bloß die Wasserstoffzahl (und die zweifellos belanglose Na-Konzentration). Wären nun die überschüssigen Chloride für eine Verschlechterung der Verdauung verantwortlich zu machen, so sollte in dieser Serie kein Optimum vorhanden sein. Dieses Optimum wurde aber auch hier beobachtet; es zeigte sich, daß es bei der gleichen h lag, wie sonst, obzwar bei ihrer Überschreitung die [Cl′] nicht, nur die h vermehrt wurde. Hieraus ist ersichtlich, daß, soweit erkennbar, nur diese letztere auf die Optimumbildung Einfluß hat.

Im übrigen gestaltete sich der Versuch folgendermaßen.

[1]) Ringer, Etudes sur la pepsine de Pekelharing. Arch. Neerland. de Physiol. de l'homme et des animaux. 1919.

Digitized by Google

Versuch IV.

Die Stammlösung wurde aus 12 ccm Serum, 15 ccm n H_2SO_4 und 93 ccm H_2O hergestellt, in sechs gleiche Teile verteilt und mit folgenden Mengen NaOH + H_2O versehen:

	1. ccm	2. ccm	3. ccm	4. ccm	5. ccm	6. ccm
n NaOH	2,5	2,3	2,1	1,8	1,3	—
H_2O	1,5	1,7	1,9	2,2	2,7	4

Nun wurden alle Gefäße in zwei gleiche Teile geteilt. Die eine Hälfte wurde mit je 0,5 ccm 0,67% Pepsinlösung 1 Stunde lang auf 37° gehalten. Dann p_H bestimmt, außerdem je 2,5 ccm in folgende Röhren gesetzt:

	1. ccm	2. ccm	3. ccm	4. ccm	5. ccm	6. ccm
n/10 NaOH	—	0,2	0,4	0,7	—	—
n NaOH	—	—	—	—	0,12	0,25
H_2O	1	0,8	0,6	0,3	0,88	0,75
Sulfosalicylsäure	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Vom Filtrat je 3 ccm (1,25 des Verdauungsgemisches) zur N-Bestimmung verwendet. Die andere Hälfte wurde mit ebensoviel abgetötetem (eine halbe Stunde lang gekochtem) Pepsin versetzt, darin p_H, außerdem Gesamt-N und der durch Sulfosalicylsäure überhaupt nicht niedergeschlagene Stickstoff bestimmt. Dieser Wert betrug hier 0,048 mg in 1,25 ccm des Gemisches. Der Versuch ergab folgende Werte:

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
p_H vor der Verdauung	6,68	3,88	—	2,16	1,74	1,3
p_H nach der Verdauung	8,77	4,1	2,67	2,25	1,79	1,32
Verdaute mg N	0	0,52	0,6	0,79	0,89	0,68

Gesamt-N 0,88 mg. Pepsinkonzentration 0,27%.

In Kurvenform:

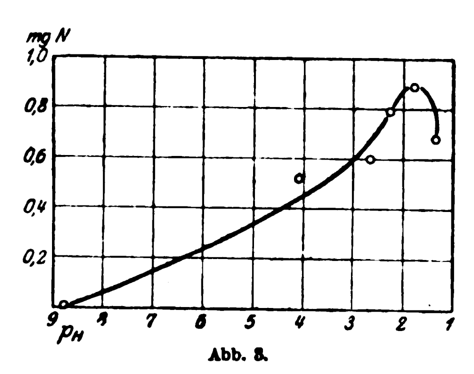


Abb. 8.

Als Nebenergebnis ist aus dieser Reihe ersichtlich, daß sich zwar die p_H mit der Verdauung infolge von Freiwerden mehrerer Aminogruppen nach der alkalischen Seite verschiebt (wie das auch von anderen Autoren ge-

Digitized by Google

funden wurde), daß jedoch diese Verschiebung in der Nähe des Optimums in dieser Versuchsanordnung ohne besonderes Bedenken zu vernachlässigen ist. Weiter finden wir — wie schon gesagt — ein ausgesprochenes Optimum bei $p_H = 1{,}79$. — Dieselbe Versuchsanordnung hat übrigens auch Sörensen gehabt. Er ging von einer sehr sauren Azidalbuminlösung aus, deren p_H er ebenfalls durch steigende Mengen NaOH variierte, und er fand trotz des konstanten Chloridgehaltes ein Optimum.

Es muß also auch der absteigende Teil der Kurve eine Funktion der Wasserstoffzahl sein, nur daß es hier nicht mehr auf die Wirkung auf das Substrat, sondern auf den Einfluß auf das Ferment ankommt.

Man gewinnt also aus alledem die Vorstellung, daß es bei der Pepsinverdauung — was das Substrat betrifft — bloß auf die Gegenwart von Eiweißkationen ankommt; ob diese in Lösung, also in hydratisiertem Zustand im Paulischen Sinne, oder in Form von grobdispersen Teilchen zugegen sind, hat auf die Lage der optimalen Wasserstoffzahl keinen Einfluß. Man könnte nun trotz der beschriebenen experimentellen Belege gewisse Bedenken gegen die Theorie erheben, indem man auf den ersten Blick unverständlich findet, wie die Tatsache, daß ein Niederschlag von Pepsin überhaupt verdaut werden kann, mit der Ladungstheorie vereinbar ist, oder wie überhaupt ein ungelöstes Substrat verdaut werden kann. In der Tat ist die Theorie in der bisher ausgesprochenen Form nur der Bedingung adäquat, daß Ferment und Substrat wirklich gelöst sind und im Stande sind, Ionen im gewöhnlichen Sinne zu bilden. Sobald das Substrat nicht molekulardispers gelöst ist, muß man eine andere Darstellungsweise wählen. Man darf dann nicht mehr von dem Dissoziationsgrad sprechen, sondern von dem Ladungszustand des Substrats. Die an der Oberfläche der Teilchen vor sich gehenden chemischen Reaktionen treten dann unter dem Bilde der Adsorptionen in Erscheinung und zwar nicht in Form der auf Oberflächenspannungen zurückzuführenden apolaren Adsorption, sondern in Form der Ionenaustauschadsorption[1]), welche ein völliges Äquivalent einer echten chemischen Reaktion ist, wie Freisetzen von Jod aus seinen Salzen durch Chlor und ähnliches. Denken wir

[1]) Michaelis und Rona, Die Adsorption der organischen Farbstoffe. Diese Zeitschr. 97. 1919.

Digitized by Google

uns ein ungelöstes Teilchen von Eiweißsulfosalicylat in Berührung mit einer Lösung von Pepsinionen, so wird an der Oberfläche des Teilchens ein Austausch von Sulfosalicylsäure-Ionen und Pepsinionen stattfinden, und genau dieselbe Reaktion, die in anderen Fällen in der Lösung vor sich geht, spielt sich hier an einer Oberfläche ab. Es stellt sich in beiden Fällen ein Gleichgewicht her zwischen dem Ferment, dem zu verdauenden Substrat und der Verbindung dieser beiden, und dieses Gleichgewicht ist in beiden Fällen von der *h* abhängig. Diese Auffassung nähert sich in mancher Beziehung der von Abderhalden und Fodor[1]); sie legen ihrer Betrachtung die Annahme zugrunde, daß das Ferment auf alle Fälle kolloidal sei und die Auffassung einer elektrolytischen Dissoziation nicht anwendbar sei, während hier gezeigt wird, wie die Vorgänge in echten Lösungen durch alle Übergänge mit denen in mikroheterogenen Systemen, oder in zweiphasigen Systemen, bei denen die eine Phase ein quellbares Öl ist, verbunden sind. Die Berechtigung, hier einen stetigen Übergang anzunehmen, zeigen die Untersuchungen von Michaelis und Davidsohn[2]) an der Invertase, wo für den Fall eines nur wenig kolloidalen Ferments die Anwendung der gewöhnlichen Dissoziationsgesetze quantitativ richtige Resultate ergibt.

3.

Es erübrigt hiermit nur noch die vielumstrittene Frage zu beantworten, wie es sich mit den verschiedenen Säuren verhält. Gemäß unserer Auffassung kommt es ja, wie es zunächst scheint, bloß auf die *h* an. Da ist nun aber folgendes zu beachten. Das Salz, das die betreffende Säure mit Eiweiß bildet, kann sehr verschieden dissoziiert sein. Im allgemeinen ist die Dissoziation der Eiweißsalze mit den gewöhnlichen Anionen ziemlich stark. Wie dem aber auch sei, es kann die Lage des Optimums je nach der Art der Säure nicht verschieden sein. Dagegen ist sehr wohl möglich, daß eine Säure, deren Eiweißsalz als weniger dissoziiert zu betrachten ist, absolut geringere Verdauungswerte liefert, weil eine Konkurrenz zwischen dem Pepsin-Anion und diesem Säure-Anion um das Eiweiß stattfindet.

---

[1]) Abderhalden und Fodor, Fermentforschung, 1, 533. 1916.
[2]) Michaelis und Davidsohn, Diese Zeitschr. 35, 386. 1911.

Digitized by Google

Northrop[1]) findet hier keine Unterschiede, vielleicht, weil er mit zu hohen Pepsinkonzentrationen arbeitet, welche die Anionenwirkung verdecken.

Wir haben, um dies zu entscheiden, HCl, H_2SO_4 und Sulfosalicylsäure miteinander verglichen. Die Reihe mit Sulfosalicylsäure haben wir schon in den ersten beiden, die mit H_2SO_4 im vierten Versuch, so daß bloß noch eine mit HCl zu machen übrig blieb.

Versuch V.

	1. ccm	2. ccm	3. ccm	4. ccm	5. ccm	6. ccm
Serum 1:10	12	12	12	12	12	12
Pepsin 1 ‰	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
nHCl	0,1	0,2	0,3	0,5	0,8	—
H_2O	0,7	0,6	0,5	0,3	—	0,8

6. war Kontrolle zur Nullpunktbestimmung. Aus den übrigen je 10 ccm abgehoben zu *h*-Bestimmung, der Rest 1 Stunde im Wasserbad bei 37° gehalten. Dann wurden folgende Gemische zugefügt:

	1. ccm	2. ccm	3. ccm	4. ccm	5. ccm
nHCl	0,18	0,15	0,13	0,08	—
H_2O	0,02	0,05	0,07	0,12	0,2
Sulfosalicylsäure	3	3	3	3	3

Im Filtrat (2 ccm) N bestimmt.

	1.	2.	3.	4.	5.
p_H	3,48	2,66	2,11	1,7	1,38
Verdauter mg N	0,05	0,4	0,59	0,57	0,51

Gesamt-N 0,89 m. Pepsinkonzentration 0,04 ‰.

Also Optimum bei 1,9 ccm.

Wenn wir die Serien vergleichen, finden wir folgendes. Innerhalb einer Reihe liegen die Optima bei gleichen PH. Dieser Befund deckt sich also mit dem von Michaelis und Mendelssohn[2]), die HCl, HNO_3, Oxal- und Weinsäure verglichen haben. Bei unserer HCl-Reihe wird vom Gesamt-N

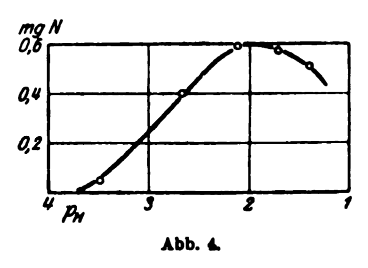


Abb. 4.

[1]) Northrop, The effect of various acids on the digestion of proteins by pepsin. Journ. of general physiology 1. 1919.

[2]) Michaelis u. Mendelssohn, Die Wirkungsbedingungen des Pepsins. Diese Zeitschr. 65. 1914.

Digitized by Google

(im Durchschnitt 0,85 mg) bei einer Pepsinkonzentration von 0,04 ‰ 0,6 mg verdaut. Die Sulfosalicylsäure bedarf einer zehnfach so hohen Pepsinkonzentration (0,4 ‰), um eine Verdauung von derselben Größenordnung zu bewirken, während bei der Schwefelsäurereihe mit einem Pepsingehalt von 0,27 ‰ alles verdaut wurde. Die Werte für Salz- und Schwefelsäure sind also ungefähr gleich zu schätzen, während sie eine sichere Erniedrigung bei der Sulfosalicylsäurereihe zeigen, eben deshalb, weil sich hier das Eiweiß zwischen Pepsin- und Sulfosalicylsäureanionen verteilt. Ebenso läßt sich erklären, daß Naphthalinsulfosäure[1]) zur Aktivierung des Pepsins nicht geeignet ist; sie besitzt nämlich so hohe Affinität zum Eiweiß daß sich das Pepsin mit ihm nicht verbinden kann.

Zusammenfassung.

1. Die Quellungstheorie der Pepsinverdauung wird durch Versuche in heterogenen Systemen widerlegt.

2. Für den ganzen Verlauf der Kurve und die Lage des Optimums wird bloß die Wasserstoffzahl verantwortlich gemacht und zwar durch ihre gleichzeitige Wirkung auf das Eiweiß und das Pepsin.

3. Die Art des Säureanions hat auf die absoluten Beträge der Verdauung in gewissen Fällen (Sulfocalizylsäure!) einen Einfluß, aber niemals auf die Lage des h-Optimums.

[1]) L. Michaelis, Die Bestimmung und Bedeutung der Fermente im Magensaft. Dtsch. med. Wochenschr. 1918, Nr. 25.

Berichtigung zur Mitteilung von E. Herzfeld und R. Klinger: Zur Chemie des Blutfarbstoffes[1]).

Von

Paul Hári.

(Eingegangen am 10. Februar 1920.)

Entgegen der Meinung der Autoren kann ich das Verdienst, den Ausdruck „Hämochrom" zum ersten Male verwendet zu haben, nicht für mich in Anspruch nehmen, da dies von seiten Christian Bohrs[2]) 1904 geschah. Seit dieser Zeit verwendeten ihn Lehr- sowohl auch als Handbücher schon lange vor dem Erscheinen meines Lehrbuches.

[1]) Diese Zeitschr. 100, 70.

[2]) Zentralbl. f. Physiol. 17, 688. 1909.

Digitized by Google

Nathan Zuntz †.

Die „Biochemische Zeitschrift" betrauert aufs tiefste den Heimgang ihres Mitbegründers Nathan Zuntz, der am 23. März 1920 sein arbeitreiches Leben beschloß.

Was Zuntz für die Biologie geleistet hat, zählt zu den Grundpfeilern dieser Wissenschaft. Seine Forschungen über den Gasstoffwechsel, über die Methoden der Gasanalyse, über die Verdauungsarbeit, über die Gärverluste der vegetabilischen Nahrungsstoffe, die Lehre von der Nahrungsdepression, seine Studien über die symbiotischen Wirkungen der Bakterien im Verdauungskanal der Pflanzenfresser bedeuten zugleich Entwicklungsperioden der Biochemie.

Unvergänglich wie die Erinnerung an solche gewaltiger Schöpfungen ist bei allen, die ihn kannten, die Erinnerung an den Menschen Zuntz, der auch groß war als Lehrer, Berater und Organisator.

C. N.

Digitized by Google

Digitized by Google

Die Zerlegung der Tyrosinase in Komponenten.

Von

Hugo Haehn.

(Mitteilung aus der Rohstoffabteilung des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin.)

(Eingegangen am 26. Februar 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In einer vorläufigen Mitteilung[1]) habe ich dargetan, daß sich die Tyrosinase der Kartoffel durch Ultrafiltration in eine thermolabile Fraktion I, als α-Tyrosinase bezeichnet, und in einen kochfesten Aktivator (Fraktion II) spalten läßt. Es wurde ferner berichtet, daß die beiden Komponenten, Fraktion I und II, jede für sich mit Tyrosin geprüft, unwirksam waren, daß jedoch das Gemisch beider wieder die normale Tyrosinasereaktion hervorrief. Im Laufe der Untersuchung hatte sich dann der Aktivator durch die Asche des Ultrafiltrates (Fraktion II) ersetzen lassen und somit war nun zunächst die weitere Aufgabe gestellt worden, die wirksamen Salzbestandteile zu ermitteln.

I. Einfluß der Basen und Säuren auf die Tyrosinasereaktion.

Es lag die Vermutung nahe, den Eintritt der Tyrosinasereaktion durch das Gemisch der Komponenten einfach durch die Herstellung einer bestimmten Hydroxylionenkonzentration erklären zu können, da bereits in der erwähnten Arbeit darauf hingewiesen wurde, daß bisher eine quantitative Trennung noch nicht geglückt sei. Mithin war man zu der Ansicht berechtigt, die ganz stark verzögerte Tyrosinasereaktion der einen Komponente (Fraktion I, α-Tyrosinase) einfach dem veränderten Reaktionsmilieu zuzuschreiben. Fraktion II hätte also die notwendige Menge Säure zur Abstumpfung der störenden Hydroxylionen. Prüfte man die beiden Ultrafiltrationen gegen Lackmus-

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 52, 2029. (1919.)

Digitized by Google

papier, so zeigte in der Tat das Filtrat (Fraktion II, Aktivator) eine viel stärkere sauere Reaktion wie der in Wasser aufgenommene Rückstand (α-Tyrosinase). Die verwendete Tyrosinlösung, bereitet durch Auflösen von 0,05 g des Kahlbaumschen Präparates in der berechneten Menge frisch ausgeglühten Natriumcarbonates, reagierte schwach alkalisch. Wurde nun hierzu die fast neutral reagierende α-Tyrosinase gegeben, so mußte der Prozeß entgegen den natürlichen Bedingungen, nämlich im schwach sauren Kartoffelsaft, im alkalischen Medium vor sich gehen, was die Ursache der äußerst starken Verzögerung sein konnte.

Diese Vermutung war gar nicht so unberechtigt, denn es zeigte sich, daß man mit saurem Kaliumphosphat allein schon die α-Tyrosinase aktivieren konnte. Gibt man nämlich zu 5 ccm Tyrosinlösung 0,2 ccm Fraktion I und 0,2 ccm einer 1%igen Monokaliumphosphatlösung, so tritt sehr bald die typische Rotfärbung, die Prämelaninbildung, ein.

Um den Einfluß der Hydroxylionenkonzentration experimentell zu prüfen, wurden Versuche mit einer schwach

Tabelle I.

Wirkt Alkali (Na_2CO_3) bei der Tyrosinasereaktion hemmend?

Tyrosinlösung I: 0,050 g Tyrosin + 0,014 g Na_2CO_3 (geglüht) in 100 ccm H_2O
Tyrosinlösung II: 0,050 g Tyrosin + 0,028 g Na_2CO_3 (geglüht) in 100 ccm H_2O.

20 ccm Preßsaft der Knolle Silesia, 2 Tage autolysiert bei Zimmertemperatur unter Thymol. Ultrafiltriert nach Bechhold mit $4^1/_2$% Filter bei 5—7 Atm. Filtrat 17 ccm: Fraktion II. Filterrückstand zweimal mit je 10 ccm Wasser gewaschen, dann in 17 ccm Wasser aufgenommen und über Nacht autolysieren lassen und durch gewöhnliches Fließpapier filtriert. Filtrat: Fraktion I.

Zimmertemperatur

Nummer	Tyrosinlösung I oder II	Zusätze der Fraktionen je 0,2 ccm	Beobachtung nach Stunden			
			$^1/_2$	2	3	20
1	5 ccm I	Fraktion I	wasserhell	wasserhell	schwach rosa	Violettfärbung
2	5 ccm I	Kontrolle				
3	5 ccm I	Fraktion I + Fraktion II	rosarot	rot bis braun	braunrot	Schwarzfärbung
4	5 ccm I					
5	5 ccm II	Fraktion I	wasserhell	wasserhell	Spur rosa	Violettfärbung
6	5 ccm II	Kontrolle				
7	5 ccm II	Fraktion I + Fraktion II	wasserhell	schwach rosa	schwach rosabraun	Schwarzfärbung
8	5 ccm II					

Digitized by Google

alkalischen Tyrosinlösung von der oben angegebenen Zusammensetzung (Tyrosinlösung I) und mit einer zweiten Lösung angesetzt, bei der das doppelte Quantum ausgeglühtes Natriumcarbonat als berechnet wurde zur Anwendung kam (Tyrosin lösung II). Auf Tabelle I finden wir denn auch deutlich, wie stark das Alkali hier die Reaktion hemmt. In der schwach alkalischen Tyrosinlösung gibt das Fraktionsgemisch schon nach einer halben Stunde eine Rosafärbung (Versuche 3 und 4), während derselbe Versuch im stärker alkalischen Medium in dieser Zeit wasserhell bleibt (Versuche 7 und 8). Erst nach 3 Stunden haben wir hier deutliche Färbung. Die Fraktion I ohne Zusatz im Kontrollversuch bleibt über zwei Stunden wasserhell.

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, daß die Hydroxylionen bei stärkerer Konzentration die Tyrosinasereaktion sehr deutlich hemmen. Da, wie schon angeführt, die Fraktion I sich in der Tyrosinlösung im alkalischen Medium befindet, so mußte ein Zusatz von Säure bis zur Neutralisation die Reaktions-

Tabelle II.

Einfluß der H- und OH-Ionen der Phosphate bei der Tyrosinasereaktion.

Tyrosinlösung I wie auf Tab. I. Fraktion I wie auf Tab. I; war jedoch durch mehrmaliges Filtrieren geschwächt worden, weshalb 0,4 ccm zu jedem Versuche genommen werden mußten. — Nr. 5 und 6 Zusatz von Essigsäure bis zur Neutralisation gegen Lackmuspapier. Bechhold-Filter. Prüfung von saurem und alkalischem Phosphat.

Zimmertemperatur

Nummer	Tyrosinlösung I	Zusätze: Fraktion I 0,4 ccm	Beobachtung nach Stunden		
			1	2	20
1	5 ccm	Fraktion I	wasserhell	schwach rosa	Violettfärbung
2	5 ccm	Kontrolle			
3	5 ccm	Fraktion I +	rot	stark rot	Violettfärbung mit Melanin
4	5 ccm	Fraktion II			
5	5 ccm	Fraktion I +			dunkel braunrot
6	5 ccm	Essigsäure			
7	5 ccm	Fraktion I +			
8	5 ccm	0,0050 g KH_2PO_4			
9	5 ccm	Fraktion I +	rosa		Violettfärbung mit Melanin
10	5 ccm	0,0070 g K_2HPO_4			
11	5 ccm	Fraktion I +	rosa		
12	5 ccm	0,0050 g K_2HPO_4			

Digitized by Google

geschwindigkeit vergrößern. In der Tat bewirkt auch ein Zusatz von Essigsäure eine starke Beschleunigung. Auf Tabelle II sehen wir, daß die Neutralisation mit Essigsäure die Prämelaninbildung stark beschleunigt hat. Während Versuche 5 und 6 nach einer Stunde bereits starke Rötung zeigten, waren die Kontrollen (Nr. 1 und 2) in dieser Zeit wasserhell geblieben. Auch andere Säuren, wie Milchsäure und Salzsäure, gaben denselben Effekt (Tab. III, Nr. 5—10). Wurde jedoch von diesen

Tabelle III.

Kann durch Zusatz von Säuren bis zur Neutralisation Fraktion I aktiviert werden?

Fraktion I von der Ultrafiltration mit Bechholdfilter. — Bei allen Säureversuchen so viel Säure bis zur Neutralisation gegen Lackmus.

Zimmertemperatur

Nummer	Tyrosinlösung I	Zusatz von Fraktion I 0,4 ccm	Beobachtung nach Stunden ½	2	20
1	5 ccm	Fraktion I Kontrolle	wasserhell	schwach rosa	violett
2	5 ccm				
3	5 ccm	Fraktion I + Fraktion II	rot	braunrot	braunviolett
4	5 ccm				
5	5 ccm	Fraktion I + Essigsäure	rosa	braunrot	braunrot mit Stich ins Schwarze
6	5 ccm				
7	5 ccm	Fraktion I + Milchsäure			
8	5 ccm				
9	5 ccm	Fraktion I + Salzsäure			
10	5 ccm				
11	5 ccm	Fraktion I + 0,0050 g KH_2PO_4			braunviolett
12	5 ccm				

Säuren der Neutralpunkt überschritten und zeigte das Medium nur eine ganz schwache Säuerung gegen Lackmus, so gab es eine so starke Verzögerung der Tyrosinoxydation, daß die Rötung erst nach Stunden eintrat.

Das gab Anlaß zur Prüfung der Frage, ob diese Reaktionshemmung nur von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig sei, oder ob die Natur der Säure hierbei auch eine Rolle spiele. Es wurden nun Tyrosinlösungen mit Essigsäure, Milchsäure und Salzsäure gegen Lackmus angesäuert und darauf mit einem Preßsaft versetzt (Tab. IV).

Digitized by Google

Tabelle IV.

Wirken H-Ionen der Essig-, Milch- und Salzsäure bei der Tyrosinasereaktion hemmend?

Es soll geprüft werden, ob Säuren, bis zur lackmussauren Reaktion zugefügt, hemmend wirken. Zur Verwendung kam 10 Tage lang bei Zimmertemperatur gelagerter Preßsaft.

Zimmertemperatur

Nummer	Schwach alkalische Tyrosinlösung	Zusätze von Preßsaft 0,2 ccm	Beobachtung nach Stunden ½	Beobachtung nach Stunden 2
1	5 ccm	Preßsaft Kontrolle	rosa	violett
2	5 ccm			
3	5 ccm	Preßsaft. Reaktionsgemisch mit Essigsäure genau neutralisiert	rot	rotbraun
4	5 ccm			
5	5 ccm	Preßsaft. Reaktionsgemisch mit Milchsäure genau neutralisiert	rot	rotbraun
6	5 ccm			
7	5 ccm	Preßsaft mit Essigsäure angesäuert	fast wasserhell	rosa
8	5 ccm			
9	5 ccm	Preßsaft mit Milchsäure angesäuert	wasserhell	Spur rosa
10	5 ccm			
11	5 ccm	Preßsaft mit Salzsäure angesäuert	wasserhell	fast wasserhell
12	5 ccm			
13	5 ccm	Preßsaft + 0,004 g KH_2PO_4	rot	rotbraun
14	5 ccm			
15	5 ccm	Preßsaft + 0,008 g KH_2PO_4	rosa	rot
16	5 ccm			
17	5 ccm	Preßsaft + 0,016 g KH_2PO_4		
18	5 ccm			
19	5 ccm	Preßsaft + 0,030 g KH_2PO_4		
20	5 ccm			

Die Kontrollversuche Nr. 1 und 2, also Versuche ohne Zusatz im schwach alkalischen Medium, zeigten nach ½ Stunde schon Rosafärbung. Die Versuche, die mit Essigsäure und Milchsäure genau neutralisiert worden waren, gaben eine etwas schnellere Rötung (Nr. 3—6). Wurden aber Ansäuerungen mit Essigsäure, Milchsäure und Salzsäure vorgenommen, so war die Reaktionshemmung sehr augenfällig (Nr. 7—12). Ein ganz anderer Effekt wird hingegen erzielt, wenn man die H-ionen in Form von primärem Kaliumphosphat hinzufügt. Hierdurch wird keine Reaktionsverzögerung bewirkt. Selbst wenn man mit 0,03 g Monokaliumphosphat so stark ansäuert (Versuche 19 und 20), daß die Lackmusrötung bedeutend intensiver ist als bei den genannten organischen Säuren, so trat dennoch die Rotfärbung in der gewöhnlichen Weise ein. Am stärksten hemmend

Digitized by Google

scheint die Salzsäure zu wirken, am wenigsten Essigsäure. Da das nach der Streckerschen Reaktion (siehe weiter unten) abgespaltene Ammoniak durch die starken Säuren gebunden wird und dasselbe sicher zur Melaninsynthese erforderlich ist, so könnte man hierin eine Erklärung für die hemmende Kraft der Säuren finden. Diese qualitativen Versuche müssen erst durch genaue Messungen der Wasserstoffionen ergänzt werden, um ein vollständiges Bild von der Wichtigkeit der Säuren für diesen Enzymprozeß zu bekommen. Hier schon die Experimente einzuschalten würde ein Abschwenken von der Hauptrichtung der Untersuchungsbahn bedeuten.

Diese Versuche lehren also, daß sowohl die Hydroxylionen (Ausnahme: sek. Kaliumphosphat. Erklärung Abschnitt IV) als auch die Wasserstoffionen (Ausnahme: prim. Kaliumphosphat) bei deutlicher Reaktion den Tyrosinaseprozeß hemmen. Er verläuft am besten in der Nähe des Neutralpunktes. Die durch die Säuren scheinbar hervorgerufene Aktivierung der Fraktion I (Tab. III, 5—10) wird durch die entstandenen Salze bewirkt, wie weiter unten näher ausgeführt werden soll (vgl. auch Tab. VII, Nr. 15 und 16).

II. Versuche zur Darstellung einer inaktiven α-Tyrosinase (Fraktion I).

Es war nun die Aufgabe zu lösen, die Fraktion I völlig rein darzustellen, um einwandfrei zu beweisen, daß die Aktivierung durch Salzzusatz vollständig gelingt. Das Bechholdfilter 4½% liefert keine reinen Präparate, auch wenn der Filterrückstand mit der 20fachen Menge Wasser nachgewaschen wird. Auch andere Porengrößen führten nicht zum Ziele. Einen gleichen Mißerfolg ergaben die Versuche mit den Membranfiltern der Firma de Haën, Hannover. Immer wurden Präparate der Fraktion I erhalten, die zwar längere Zeit, 2—4 Stunden, gegen Tyrosinlösung unwirksam waren, dann aber trat, jedoch ganz allmählich, eine schwache Rötung ein. Es müssen demnach in Fraktion I kleine Mengen von Stoffen zurückbehalten werden, die die α-Tyrosinase ganz schwach aktivieren.

Da sich mittlerweile herausgestellt hatte, daß die Aschensalze eine so wichtige Rolle bei der Tyrosinasereaktion spielen, so wurde zur Trennung das Dialyseverfahren herangezogen. Sowohl ein

Digitized by Google

mehrtägiges Dialysieren durch Pergamentpapier (zur Verwendung kamen die bekannten Dialysierschläuche) als durch eine Kollodiummembran gaben auch nicht die erwünschten Präparate. Sie waren immer noch schwach wirksam, wenn auch keine Fraktion II zugefügt worden war.

Als letztes Mittel wurde ein sog. Fischblasenkondom, angeblich aus Hammelblinddarm präpariert, zur Dialyse herangezogen. Diese Membran ist infolge ihrer dünnen Struktur besonders hierzu geeignet und man beobachtet sofort bei Beginn der Dialyse ein Herabfallen von Salzschlieren aus dem Beutel. Man hängt ihn mit 20 ccm Preßsaft gefüllt in ein großes Becherglas mit viel destilliertem Wasser und erneuert dasselbe öfters. Über Nacht ist der rote Farbstoff des Kartoffelsaftes, das Prämelanin, in das Wasser diffundiert.

Beispiel: Nachdem der Preßsaft der Kartoffel Silesia 2 Tage autolysiert hatte, wurde er noch 3 Tage dialysiert; 20 ccm Preßsaft gegen 600 ccm dest. Wasser. Das Volumen des Preßsaftes hatte sich durch Wasseraufnahmen verdoppelt. Wurden 0,4 ccm des Rückstandes mit 5 ccm Tyrosinlösung versetzt, so trat nach 1½ Stunden eine schwache Rötung ein. Nach 4 tägiger Dialyse setzt sich ein schwacher Niederschlag ab; die darüber stehende Flüssigkeit ist wasserhell. Wird der Niederschlag aufgeschlemmt und werden 0,4 ccm ohne Zusatz auf Tyrosin geprüft, so erhält man erst nach 4 Stunden eine geringe Rötung.

Dieser Dialyserückstand, der also nahezu frei von Fraktion II ist, wurde nun auf Aschebestandteile geprüft und es stellte sich heraus, daß 10 ccm nur 0,0025 g gaben (= 0,025%). Nachgewiesen wurden bisher Eisen und Phosphorsäure. Da die weiter unten beschriebenen Versuche die Wirksamkeit ganz geringer Salzdosen — 0,2 ccm Dialyserückstand werden bereits von 0,08 mg Calciumchlorid (= 0,04%) aktiviert (Tab. IX, Nr. 17 und 18) — erwiesen haben, so haben wir hierin den Grund unserer Mißerfolge bei der vollständigen Inaktivierung zu suchen. Der kleine zurückgebliebene Salzbestand von 0,025% genügt gerade noch zur schwachen Aktivierung. Leider ist er auf mechanischem Wege nicht zu entfernen; vielleicht handelt es sich um Adsorptionsverbindungen mit Kolloiden.

Um zu zeigen, daß die Inaktivierung der Tyrosinase mit der Entsalzung des Preßsaftes fortschreitet, kam folgender Versuch zur Ausführung:

Digitized by Google

Im Originalpreßsaft, der 2 Tage bei Zimmertemperatur autolysiert hatte, wurde die Asche bestimmt; 10 ccm ergaben 0,1998 g (Tab. V). Die Tyrosinasereaktion, mit 0,4 ccm Fraktion I angesetzt, war in 15 Minuten eingetreten. Nach einem Tage

Tabelle V.

Die Inaktivierung der Tyrosinase durch Entsalzung mittels Dialyse (Fischblasenkondom).

Material: Saft der Knolle Silesia, die 1¹/₄ Jahr im Keller gelagert hat. Sie ist welk und etwas schwarzfleckig.

Nummer	Preßsaft 2 Tage autolysiert	Asche in g	Tyrosinreaktion mit 5 ccm Tyrosinlösung + 0,4 ccm Saft tritt ein nach
1	10 ccm ohne Dialyse	0,1998	15 Minuten (hier, weil unverdünnt, 0,2 ccm Saft)
2	10 ccm 1 Tag dialysiert	0,0102	40 „
3	10 ccm 3 Tage „	0,0030	60 „
4	10 ccm 4 „ „	0,0016	90 „
5	10 ccm 5 „ „	0,0012	100 „
6	10 ccm 6 „ „	0,0010	120[1]) „
1[2])	10 ccm ohne Dialyse	0,1970	45 Minuten (0,2 ccm Saft)
2	10 ccm 1 Tag dialysiert	0,0195	135 „
3	10 ccm 2 Tage „	0,0010	180 „
5	10 ccm 4 „ „	0,0004	225 „
6	10 ccm 5 „ „	0,0003	240 „

Dialyse enthalten 10 ccm von demselben Saft (auf unverdünnten Originalpreßsaft berechnet) 0,0102 g Asche. Die Rötung der Tyrosinlösung trat erst nach 40 Minuten ein. Nach 4tägiger Dialyse finden wir nur 0,0016 g Asche und eine Wirkungszeit von 90 Minuten bis zum Eintritt der Tyrosinasereaktion. Ein weiterer Tag Dialyse verändert dieses Resultat wenig. Wir sehen also deutlich, wie die Stärke des Tyrosinasepräparates vom Salzgehalt abhängig ist und daß eine vollständige Entsalzung nicht zu erzielen war. Ein Parallelversuch auf gleicher Tabelle bestätigt dieses Resultat.

Es liegt der Gedanke nahe, die Tyrosinase in dieser Hinsicht mit der Leberdiastase zu vergleichen, die bekanntlich nach Starkenstein[3]) auch in eine organische Fraktion und einen

¹) Die lange Dialyse schwächt auch noch aus anderen Gründen.
²) Das zweite Tyrosinasepräparat ist schon an sich sehr schwach.
³) E. Starkenstein, diese Zeitschr. 24, 210. 1910; 47, 300. 1912.

Digitized by Google

Salzaktivator — hier Chlornatrium — zerlegt werden kann. Da die Diastase[1]) zur Aktivierung eine beträchtliche Menge von dem Salz benötigt, so war es bei so großer Dosis keine Schwierigkeit, ein vollständig inaktives Präparat bei der Dialyse zu erhalten. Auch hier scheint die Reaktion nicht streng von einem bestimmten Salze abhängig zu sein, denn die Diastasewirkung ließ sich auch nach Hugh, Neilson und Terry[2]) durch citronensaures Natrium beschleunigen. Starkenstein hebt auch hervor, daß bei Pflanzendiastasen eine vollständige Inaktivierung nicht zu erreichen war. Wir hätten also in der Pflanzentyrosinase einen ähnlichen Fall vor uns.

Auch an einen Vergleich mit der Pepsinase wäre zu denken. Das Salz würde in unserem Falle etwa dieselbe Rolle spielen wie die Salzsäure bei der Pepsinase. Der Vergleich geht noch weiter. Wie die Wirkung des verdauenden Enzyms nicht nur an eine bestimmte Säure gebunden ist, sondern nur an die Beihilfe der Wasserstoffkationen, so kann auch unsere Oxydase durch verschiedene Kationen aktiviert werden, wie die nächsten Versuche zeigen. Zu beachten ist ferner, daß sich ganz geringe Säuremengen bei der Pepsinase schon bemerkbar machen.

Im Anschluß hieran sei auch darauf hingewiesen, daß das Ko-Enzym der Zymase nach C. Neuberg und E. Schwenk[3]) durch Salze der α-Ketosäuren vertreten werden kann. Nach diesen Forschern hat sich das Gemisch der Salze verschiedener α-Ketosäuren als befähigt erwiesen, „koenzymfreie" Hefemacerationssäfte sowie „koenzymfreie" Trockenhefe derart zu aktivieren, daß sie Traubenzucker, Fruktose wie Rohrzucker, wenn auch bei mäßigem Umfange, vergären.

Es ist also ohne Zweifel, daß Salze oder Kationen bei der Aktivierung verschiedener Enzyme eine große Rolle spielen. Auch die Tyrosinase bedarf unbedingt zur Entfaltung ihrer Tätigkeit eines Salzes.

---

[1]) Es sei noch erwähnt, daß Speichel-Blutserum- und Pankreasdiastase auch durch Dialyse inaktiviert und durch Kochsalz reaktiviert werden können. Cole, Henri, Preti und Wohlgemuth, diese Zeitschr. 9, 16. 1908.

[2]) Hugh, Neilson und Terry, Amer. journ. of physiol. 14, 105. Malys Jahresber. d. Tierchemie 35, 528.

[3]) C. Neuberg u. E. Schwenk, diese Zeitschr. 71, 135. 1915.

Digitized by Google

III. Aktivierung der Fraktion I durch verschiedene Salze (Wirkung der Kationen).

Um zu erkunden, welches Kation wohl den unwirksamen Dialyserückstand zur Melaninbildung befähige, wurden von einer großen Anzahl der bekannten Metalle $^{n}/_{10}$-Salzlösungen hergestellt und damit die Aktivierung versucht. Es stellte sich dabei die

Tabelle VI.

Aktivierung der Fraktion I durch verschiedene Salze.

Preßsaft der Knolle Silesia, 2 Tage autolysiert, 5 Tage durch Fischblasenkondom dialysiert. Das Volumen des Preßsaftes hatte sich durch die Dialyse verdoppelt.

Zimmertemperatur

Nr.	0,05 g Tyrosin 0,04 g Soda 100 ccm Wasser	Fraktion I 0,2 ccm + Salze in g	Beobachtung nach Stunden $^{1}/_{2}$	1	2	$2^{1}/_{2}$
1 2	5 ccm 5 ccm	Fraktion I Kontrolle	wasserhell	wasserhell	wasserhell	Spur rosa
3 4	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + Fraktion II 0,2 ccm	rosa	rot	rotbraun	rotbraun
5 6	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$; 0,0021	rosa	violettrot	schwarz-violett	schwarz-violett
7 8	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $Sr(NO_3)_2$; 0,0021	rosa	violettrot	schwarz-violett	schwarz-violett
9 10	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $BaCl_2 \cdot 2\,H_2O$; 0,0024	rosa	violettrot	violettrot	schwarz-violett
11 12	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$; 0,0024	wasserhell	rosa	violettrot	violett-rot
13 14	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + KCl; 0,0028	wasserhell	wasserhell	wasserhell	Spur rosa
15 16	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + NaCl; 0,0022	wasserhell	wasserhell	Spur rosa	rosa
17 18	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $Al_2(SO_4)_3$; 0,0066 $16\,H_2O$	wasserhell	wasserhell	wasserh. mit Al-Flocken-niederschlag	wie nach 2 Std.
19 20	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $CdSO_4 \cdot \frac{8}{3}\,H_2O$; 0,0025	bläulich	bläuliche Suspens.	blaue Suspens.	wie nach 2 Std.
21 22	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$; 0,0025	eigene grünblaue Cu-Färb.	eigene grünblaue Cu-Färb.	eigene grünblaue Cu-Färb.	wie nach 2 Std.
23 24	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $MnSO_4 \cdot 5\,H_2O$; 0,0024	wasserhell	wasserhell	wasserhell	wie nach 2 Std.
25 26	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$; 0,0057	stark bläulich	bläuliche Suspens.	blaue Suspens.	wie nach 2 Std.

überraschende Tatsache heraus, daß die meisten Metalle wirksam waren und daß einige sogar die physiologische Wirkung der Fraktion II weit übertrafen. Das Kation des Calciums ist recht aktiv und wenn man sich daran erinnert, daß in der Kartoffel-

Digitized by Google

asche auch Calcium zu finden ist, so möchte man diesem Metall bei der Tyrosinasereaktion im Kartoffelsaft eine wichtige Rolle zuschreiben. Von anderen Aschensalzen wirkt auch Magnesium ziemlich kräftig, während Kalium und Natrium schwächer sind. Eisen und Mangan, die in kleinen Mengen in der Pflanze auftreten könnten, sind in dieser Dosis vollständig ohne Wirkung.

Tabelle VII.

Aktivierung der Fraktion I durch verschiedene Salze.

Preßsaft der Knolle Silesia, 2 Tage autolysiert, 5 Tage durch Fischblasenkondom dialysiert. Das Volumen des Preßsaftes hatte sich durch die Dialyse verdoppelt.

Zimmertemperatur

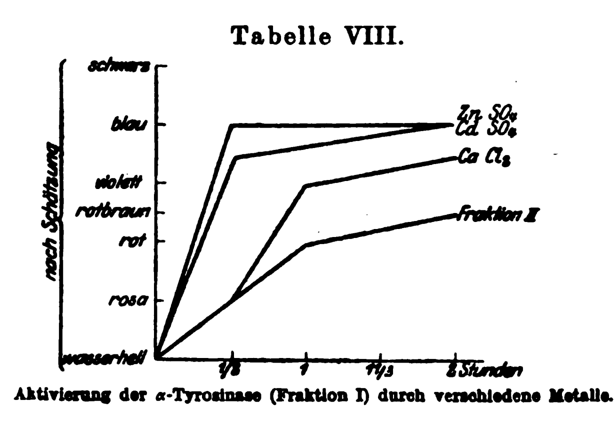
Nr.	0,05 g Tyrosin 0,04 g Soda 100 ccm H_2O	Fraktion I 0,4 ccm + Salze in g	Beobachtung nach Stunden 1	2	4
1 2	5 ccm 5 ccm	Fraktion I Kontrolle	wasserhell	wasserhell	schwach rosa
3 4	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $CaCl_2 \cdot 6 H_2O$; 0,0021	rosa	rotviolett	stark rotviolett
5 6	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $CdSO_4 \cdot \frac{8}{3} H_2O$; 0,0076	blau	blauviolett	stark blauviolett
7 8	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $AgNO_3$; 0,0017	rosafarb. Niederschlag	viol.-farb. Niederschlag	viol.-farb. Niederschlag
9 10	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $Pb(NO_3)_2$; 0,0033	milchiger Niederschlag	schwach blauviolett	blauviolett
11 12	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $HgCl_2$; 0,0027	wasserhell	wasserhell	wasserhell
13 14	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $UO_2(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2 H_2O$ 0,0042	hellgrüne Eigenfärbung	hellgrüne Eigenfärbung	graugrün
15 16	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + $CH_3 \cdot COONa + 3 H_2O$ 0,0013	wasserhell	schwach rosa	rosa

Auf Tab. VI und VII finden wir eine Zusammenstellung der Versuche. Der Preßsaft der Knolle Silesia hatte erst 2 Tage lang bei Zimmertemperatur autolysiert und dialysierte dann 5 Tage lang im Fischblasenkondom. 0,2 ccm des Dialyserückstandes blieben, mit 5 ccm Tyrosinlösung versetzt, nahezu 2½ Stunden wasserhell, dann erst trat eine geringe Rötung ein (Tab. VI, Nr. 1 und 2). Ein gleicher Versuch mit Fraktion II versetzt, gab bereits nach ½ Stunde die Tyrosinasereaktion. Mithin war auch hier durch die Dialyse der Preßsaft in die nahezu unwirk-

Digitized by Google

same Fraktion I und Fraktion II zerlegt worden. Bei Versuchen Nr. 5 und 6 geschah die Aktivierung durch 0,0021 g Calciumchlorid, wodurch eine lebhafte Reaktion ausgelöst wurde. Die Rötung trat sehr bald ein und während der Kontrollversuch nach 2 Stunden noch wasserhell, der Aktivierungsversuch mit Fraktion II in dieser Zeit noch rotbraune Farbe zeigte, hatte der Chlorcalciumversuch bereits schwarzviolettes Melanin. Wir sehen hier die außerordentlich günstige Wirkung dieses Erdalkalimetalles. Strontiumnitrat und Bariumchlorid geben dasselbe Reaktionsbild und beweisen gleichzeitig, daß es sich hierbei weder um den Einfluß des Salpetersäure- noch des Chloranions, sondern um Kationenwirkung handelt. Aus der langen Reihe der Metalle treten Cadmium und Zink ganz besonders durch die Intensität ihrer Wirkung hervor. Beide geben bereits nach ½ Stunde ein „blaues" Melanin, eine ganz feine Suspension, die nach einiger Zeit in schwarze Flocken übergeht. Hier wird die rote Stufe der Tyrosinosereaktion durch die große Reaktionsgeschwindigkeit übersprungen, doch kann man mit Cadmiumsalzen bei vorsichtigem Experimentieren in kleinen Dosen auch vorübergehend das rote Prämelanin erhalten. Zink, in kleinster Menge angewendet, läßt immer nur den blauen Stoff auftreten. Hiernach ist von beiden Metallen das Zink das kräftigere. Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, daß die Melaninbildung eine Farbenstufenreaktion ist, bei der die Farben Rosa, Rot, Rotbraun, Violettrot, Dunkelblau, Schwarz immer in derselben Reihenfolge bei nicht seltenem Überspringen von einigen Stufen durchlaufen werden. Näheres über den Reaktionsmechanismus erfolgt weiter unten.

Tabelle VIII.



Aktivierung der α-Tyrosinase (Fraktion I) durch verschiedene Metalle.

Digitized by Google

Tab. VIII illustriert graphisch die Wirksamkeit der verschiedenen Metalle. Die Linie des Kontrollversuchs (Tab. VI, 1 und 2), der zwei Stunden wasserhell bleibt, würde mit der Abscisse zusammenfallen. Die Fraktion II aktiviert so stark, daß in ½ Stunde Rosafärbung, in einer Stunde Rötung eintritt. Dann erhält man allmählich einen rotbraunen Ton. Wird Fraktion I durch Calciumchlorid zur Reaktion angeregt, so ist nach einer Stunde schon Violettfärbung da. Wir sehen deutlich, wie der natürliche Tyrosinaseprozeß durch den Ersatz der Fraktion II durch Calciumchlorid übertroffen wird. In noch stärkerem Maße beobachten wir diese Erscheinung beim Cadmium und Zink. Von den übrigen Metallen zeichnen sich nur Silber und Blei in dieser Konzentration durch geringes Aktivierungsvermögen aus (Tab. VII).

Tabelle IX.

Aktivierung der Fraktion I durch Calciumchlorid.

Preßsaft Silesia, 2 Tage autolysiert, 2 Tage durch Fischblasenkondom dialysiert. Hatte sich auf das doppelte Volumen vergrößert. Versuche mit 0,2 ccm angesetzt, also 0,1 ccm des Originalsaftes.

Nummer	0,05 g Tyrosin 0,04 g Soda 100 ccm H_2O	Zusätze von Fraktion I 0,2 ccm u. Salzen	Beobachtung nach Stunden			
			1/4	1	1 1/2	20
1 2	5 ccm 5 ccm	Fraktion I Kontrolle	wasserhell	wasserhell	schwach rosa	violett
3 4	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + Fraktion II	rosa	rosa	stark rosa	schwärzlich rot
5 6	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,0057 g $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	bläulich	blau	blau	schwarz. Sediment
7 8	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,0007 g $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	bläulich	blau	dunkelblau	tiefblaue Färbung
9 10	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,0057 g $CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$	rosa	violett	schwarzviolett	schwarz. Sediment
11 12	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,0014 g $CaCl_2 \cdot 6\,H$	rosa	violettrot	schwarzviolett	schwarz. Sediment
13 14	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,0007 g $CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$	schwach rosa	violettrot	schwarzviolett	schwarz. Sediment
15 16	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,00035 g $CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$	schwach rosa	rosa	violettrot	schwarzviolett
17 18	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,00017 g $CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$ oder 0,00008 g $CaCl_2$ wasserfrei	schwach rosa	rosa	violettrot	schwarzviolett
19 20	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,00008 g $CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$	wasserhell	wasserhell	schwach rosa	violett
21 22	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,00004 g $CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$	wasserhell	wasserhell	schwach rosa	violett

Digitized by Google

Zu den Metallen, die sich unter den gegebenen Bedingungen passiv verhalten, gehören Kalium, Natrium (wirkt äußerst gering), Aluminium, Kupfer, Mangan, Eisen, Quecksilber, Uran (Tab. VI und VII). Es gelingt jedoch, alle Metalle zu schwacher Reaktion zu bringen, wenn man geeignete Konzentrationen aussucht. Bei unseren Experimenten versagte bisher nur Quecksilber. Auch war Eisen sehr ungeeignet.

Vom agrikulturchemischen Standpunkte aus haben Magnesium und Calcium, Kalium und Natrium Interesse, da sie von der Kartoffelpflanze aufgenommen werden. Es ist somit außer Zweifel, daß die Tyrosinase des ursprünglichen Kartoffelsaftes vorzugsweise durch Magnesium- und Calciumsalze aktiviert wird.

Um nun die Feinheit der Reaktion zu studieren, sollte die Fraktion I durch geringe Dosen von Calciumchlorid in Tätigkeit versetzt werden. Nachdem wir uns von der guten Qualität unseres Enzympräparates durch die Kontrollversuche Nr. 1—8 auf Tab. IX überzeugt hatten, beobachten wir, daß das Chlorcalcium in den verschiedensten Konzentrationen lebhaft wirkt. Sogar die kleine Menge von 0,08 mg vermag sich schon in 5 ccm Tyrosinlösung bei Zusatz von 0,2 ccm Fraktion I (also 0,04% auf Fraktion I ber.) nach ¼ Stunde bemerkbar zu machen und man erkennt hieraus wieder die große Wichtigkeit geringer Salzmengen für biochemische Reaktionen. So wird sich auch allmählich das verschleierte Bild von den „Nährsalzen“ der Organismen immer mehr enthüllen.

Von den großen Chlorcalciumdosen (Tab. X) aktivierten 0,06 g noch ganz stark. Wird ein Gewicht von 0,16 g erreicht, so machen sich bereits Hemmungen bemerkbar. Man sieht also, daß das Chlorcalcium in großen Intervallen der Konzentration wirksam sein kann, was gleichzeitig für eine große Toleranz gegen dieses physiologisch wichtige Metall spricht.

Auf Tab. XI haben wir in ähnlicher Versuchsanstellung wie mit dem Calciumchlorid die Resultate mit dem Zinkion. Wir beobachten bei allen Versuchen den Eintritt der Reaktion durch die Bläuung der Tyrosinlösung. Auch hier sind noch die Substanzmengen in derselben Größenordnung tätig wie bei dem Chlorcalcium. Von beiden Metallen aber zeichnet sich das Zink, wie bereits dargetan wurde, durch die größere Beschleunigung der Tyrosinasereaktion aus.

Digitized by Google

Tabelle X.

Aktivierung der Fraktion I durch Calciumchlorid.

Preßsaft der Knolle Silesia, 2 Tage autolysiert, 4 Tage durch Fischblasenkondom dialysiert. Volumen hatte sich verdoppelt.

Nummer	Tyrosinlösung I	Zusätze: Fraktion I + $CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$ in g	Beobachtung nach Stunden		
			1/2	2	3 1/2
1 2	5 ccm 5 ccm	Fraktion I Kontrolle	wasserhell	wasserhell	schwach rosa
3 4	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,01	schwach rosa	rot	stark violett
5 6	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,02	schwach rosa	rot	stark violett
7 8	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,06	schwach rosa	rot	stark violett
9 10	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,16	wasserhell	schwach rosa	rot
11 12	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,2	wasserhell	schwach rosa	rot

Tabelle XI.

Aktivierung der Fraktion I durch Zinksulfat.

Preßsaft der Kartoffel Silesia 5 Tage lang autolysiert, 3 Tage durch eine Collodiummembran dialysiert.

Nummer	Tyrosinlösung I	Zusätze von Fraktion I 0,2 ccm u. $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$ in g	Beobachtung nach Stunden			
			1	2	3	20
1 2	5 ccm 5 ccm	Fraktion I Kontrolle	hell	hell	schwach rosa	rotviolett
3 4	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + Fraktion II	rosa	rosa	rosa	Melaninbildung
5 6	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,0057	blau	blau	blau	blauviolett
7 8	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,0014	blau	blau	blau	violett
9 10	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,0007	schwach violett	blau	blau	violett
11 12	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,00035	hell	violett	blau	violett
13 14	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,00017	hell	schwach violett	schwach violett	violett
15 16	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,00008	hell	Spur violett	Spur violett	violett
17 18	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,00004	hell	hell	Spur violett	rosaviolett

Digitized by Google

IV. Aktivierung der Fraktion I durch das Phosphatanion.

Interessant ist, wie eine Reihe von Versuchen ergeben haben, daß nicht nur Kationen, sondern auch das Phosphatanion die Aktivierung hervorruft. Tab. XII zeigt die Wirksamkeit schon ganz geringer Mengen von prim. Kaliumphosphat. Da das Kaliumion nur in stärkerer Konzentration wirkt, so muß hier das

Tabelle XII.
Aktivierung der Fraktion I durch primäres Kaliumphosphat.

Preßsaft Silesia 3 Tage autolysiert, dann 2 Tage durch Pergamentpapier dialysiert. Der Dialyserückstand hat sich von 20 ccm von selbst auf 25 ccm verdünnt. (= Fraktion I.)

Nr.	0,05 g Tyrosin 0,04 g Soda 100 ccm H_2O	Zusatz von Fraktion I 0,2 ccm	Beobachtung nach Stunden		
			$^1/_4$	$^1/_2$	$1^1/_2$
1	5 ccm	Fraktion I Kontrolle	wasserhell	wasserhell	ganz schw. rosa
2	5 ccm				
3	5 ccm	Fraktion I + Fraktion II	rosa	stark rosa	rotbraun
4	5 ccm				
5	5 ccm	Fraktion I + 0,005 g KH_2PO_4	wasserhell mit geringer grauer Eigentrübung	rosa	stark rot
6	5 ccm				
7	5 ccm	Fraktion I + 0,002 g KH_2PO_4		rosa	
8	5 ccm				
9	5 ccm	Fraktion I + 0,001 g KH_2PO_4		ganz schw. rosa	
10	5 ccm				
11	5 ccm	Fraktion I + 0,0005 g KH_2PO_4		wasserhell	rosa
12	5 ccm				
13	5 ccm	Fraktion I + 0,00025 g KH_2PO_4			ganz schwach rosa
14	5 ccm				
15	5 ccm	Fraktion I + 0,0001 g KH_2PO_4			
16	5 ccm				
17	5 ccm	Fraktion I + 0,00006 g KH_2PO_4			
18	5 ccm				
19	5 ccm	0,2 ccm Originalpreßsaft; 5 Tg. autolysiert	rosa	rot	rotbraun
20	5 ccm				

Anion die Aktivierung veranlassen. Um den Einfluß des Reaktionsmilieu auszuschalten, wurden Versuche mit saurem und alkalisch reagierenden Phosphaten angesetzt. Ein Zusatz von 0,005 g KH_2PO_4 aktivierte die Fraktion I fast ebenso schnell wie 0,005 g K_2HPO_4, obgleich die Alkalität der Tyrosinlösung zugenommen hatte. Selbst wenn eine weitere Steigerung der Hydroxylionenkonzentration durch Zusatz von 0,0070 g K_2HPO_4 erfolgte, so blieb das Resultat dasselbe (Tab. II, Nr. 7—12).

Digitized by Google

Diesen interessanten Befund kontrollierte eine Versuchsreihe mit ganz geringen Dosen von sekundärem Kaliumphosphat (Tab. XIII). Als Fraktion I diente hierzu der Rückstand einer

Tabelle XIII.

Wirkt die Preßsaftasche auf Fraktion I aktivierend? Wirkt sekundäres Kaliumphosphat aktivierend auf Fraktion I, hergestellt durch Dialyse?

Fraktion I: Dialyserückstand einer 5tägigen Dialyse. — Die Aschelösung wurde deutlich alkalisch gemacht[1]).

Zimmertemperatur

Nummer	Tyrosinlösung 0,05 g Tyrosin 0,04 g Soda 100 ccm Wasser	Zusätze der Fraktion I 0,2 ccm	Beobachtung nach Stunden			
			1/2	1	2	20
1 2	5 ccm 5 ccm	Fraktion I Kontrolle	wasserhell	wasserhell	schwach braun	schwarze Melaninbildung
3 4	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,6 ccm Aschelösung	Rötung	violett mit Stich ins Schwarze	sehr stark schwarzviolett	
5 6	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,0050 g K_2HPO_4	schwach rosa	hellbr. mit Stich ins Schwarze	schwarzviolett	
7 8	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,0020 g K_2HPO_4	Spur rosa	etwas schwächer wie 5 u. 6	etwas schwächer wie 5 u. 6	
9 10	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,0010 g K_2HPO_4	wasserhell	Spur braun	geringe Schwarzviolettfärbung	
11 12	5 ccm 5 ccm	Fraktion I + 0,0005 g K_2HPO_4[2])				

5tägigen Preßsaftdialyse. Die Kontrollversuche Nr. 1 und 2 blieben 1 Stunde lang wasserhell, während in dieser Zeit die Versuche mit dem alkalischen Phosphat schon Färbungen zeigten. 0,005 g K_2HPO_4 wirkten natürlich am stärksten, aber auch 0,002 g waren in dieser Stunde sehr tätig. Einen deutlichen, wenn auch schwachen Effekt gab die geringe Dosis von 0,0005 g. Das ist jedenfalls ein deutliches Zeichen, daß das Phosphorsäureanion bei der Tyrosinasereaktion aktiv beteiligt ist. Die günstige Wirkung des Anions ist mithin stärker als der hemmende Einfluß des Hydroxyls des sekundären Phosphates.

[1]) Hergestellt wie im Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 52, 2037. (1919.)

[2]) Die Fraktion I bedarf also zur Aktivierung eines Zusatzes von 0,25% K_2HPO_4.

Digitized by Google

In der Literatur findet man meines Wissens nach keine Notiz über die Beziehungen der Tyrosinase zur Phosphorsäure. Oppenheimer schreibt in seinem bekannten Werke „Die Fermente“ über die Tyrosinase, daß für sie noch kein Aktivator gefunden sei. Jedoch soll der neutrale Glycerinauszug aus Champignons bei Gegenwart von zweibasischem Phosphat oder dreibasischem Citrat Orcin, Cochenille und Alizarin oxydieren. Oppenheimer bemerkt hierzu, ob es sich hier um eine Ko-Enzymwirkung oder um eine Wasserstoffionenregulierung handelt, muß noch festgestellt werden[1]).

Bei anorganischen Oxydasen spielen nach Wolff[2]) und de Stoecklin die Phosphate die Rolle von Ko-Enzymen. Eisen und zweibasisches Phosphat oxydieren z. B. Hydrochinon.

Diese Literaturstellen deuten auf eine gewisse Wichtigkeit der Phosphorsäure für die Oxydationsenzyme hin. Da jedenfalls in der Tyrosinase eine besondere Art von Oxydase vorliegt, so ist uns hier die Funktion dieser Säure keineswegs klar. Erinnert man sich an die Rolle der Phosphorsäure bei der Vergärung des Zuckers (Harden und Young), so könnte man auch hier die Möglichkeit einer Doppelverbindung von Phosphaten mit dem Tyrosin als Zwischenprodukt ins Auge fassen. Daß es sich hier nicht um die Wirkung einer Veränderung des Reaktionsmilieus handelt, zeigen die Versuche im sauren wie im alkalischen Medium. Selbst die alkalisch gemachte Asche des Preßsaftes konnte Aktivierung hervorrufen, was auch für das Phosphorsäureanion spricht. (Tab. XIII, Nr. 3 und 4) Weitere Arbeiten müssen sich mit der Klärung dieser Frage befassen. Der schwach saure Kartoffelsaft enthält wahrscheinlich primäres Kaliumphosphat, das ebenfalls Anteil an der natürlichen Melaninbildung im Kartoffelsaft haben wird.

V. Natur der α-Tyrosinase.

Über die andere Komponente der Tyrosinase, der α-Tyrosinase muß gesagt werden, daß sie organischer Natur sein muß, da eine Erhitzung die Wirkung aufhebt. Auch die Asche der Fraktion I kann durch die Fraktion II nicht aktiviert werden. Der Ausfall dieses Versuches ist keineswegs so selbst-

[1]) Oppenheimer, Die Fermente II, 764, IV. Auflage.

[2]) Wolff u. de Stoecklin, Compt. rend, 153, 139. 1911.

Digitized by Google

verständlich, denn es wäre möglich, daß beim Aufkochen der Fraktion I die etwaigen wirksamen anorganischen Salze von dem Eiweißgerinnsel eingeschlossen werden könnten, wodurch deren Tätigkeit verhindert würde. Genauere Prüfungen ergaben, daß ein Erhitzen über 70° die Zerstörung der α-Tyrosinase bewirkt. Auf Tab. XIV sehen wir zunächst, daß frischer Preßsaft durch 15 Minuten langes Erwärmen auf 60° nicht unwirksam gemacht werden kann. Wählt man eine um 10° höher liegende

Tabelle XIV.

Zerstörung der Tyrosinase durch Wärme.

Frischer Preßsaft v. Silesia, 15 Minuten lang erhitzt auf 60, 70, 80 und 95°.

a) Preßsaft nach dem Erwärmen nicht filtriert.

Nummer	Tyrosinlösung	Saft erhitzt auf				Beobachtung nach Stunden		
		60°	70°	80°	95°	1/4	2	20
1	5 ccm	0,2 ccm				rot	dunkelrot	dunkle Melaninfärbung
2	5 ccm	0,2 ccm						
3	5 ccm		0,2 ccm			rosa	rot	
4	5 ccm		0,2 ccm					
5	5 ccm			0,2 ccm		wasserhell	wasserhell	wasserhell
6	5 ccm			0,2 ccm				
7	5 ccm				0,2 ccm	wasserhell		
8	5 ccm				0,2 ccm			

b) Preßsaft nach dem Erwärmen filtriert.

Nummer	Tyrosinlösung	Saft erhitzt auf				Beobachtung nach Stunden		
		60°	70°	80°	95°	1/4	2	20
1	5 ccm	0,2 ccm				rot	dunkelrot	dunkle Melaninfärbung
2	5 ccm	0,2 ccm						
3	5 ccm		0,2 ccm			rosa	rot	
4	5 ccm		0,2 ccm					
5	5 ccm			0,2 ccm		wasserhell	wasserhell	wasserhell
6	5 ccm			0,2 ccm				
7	5 ccm				0,2 ccm	wasserhell		
8	5 ccm				0,2 ccm			

Temperatur, so beobachtet man zwar eine Schwächung, aber keine vollständige Inaktivierung des Enzyms, die dann erst bei 80° eintritt. Aus diesen Versuchen könnte man schließen, daß es sich hier nicht um eine gewöhnliche, gerinnbare Eiweißverbindung handeln kann. Diese Ansicht wird noch dadurch ge-

Digitized by Google

stützt, daß man den Preßsaft ohne besondere Nachteile längere Zeit, 5—10 Tage, bei Zimmertemperatur lagern lassen kann Da durch andere Versuche bewiesen ist, daß hierbei eine starke Proteolyse eintritt, so müßte die α-Tyrosinase als echte Eiweißverbindung abgebaut werden, wie das z. B. bei der Hefezymase der Fall ist. Wahrscheinlich ist das Enzym kein Protoid im gewöhnlichen Sinne, sondern ein organischer Stoff, der durch längeres Kochen zerstört wird. Dabei ist es nun bei der Versuchsanstellung gleichgültig, ob der erwärmte Preßsaft vor der Prüfung mit Tyrosinlösung filtriert wird oder nicht. Bleiben diese erwärmten Säfte 5 Tage unter Thymol bei Zimmertemperatur stehen, so erhält man bei der Untersuchung mit Tyrosinlösung wieder dasselbe Resultat: der bis 70° erhitzte Saft ist noch wirksam, der bis 80° gehaltene unwirksam. Der Zweck des Versuches war jedoch der, zu erfahren, ob die inaktiven Proben durch Lagern wieder wirksam geworden sind, wie man das bei manchen Enzymen gelegentlich beobachtet hat.

VI. Theorie der Tyrosinasewirkung.

Wie geht nun die Aktivierung der α-Tyrosinase durch Metallsalze vor sich? C. Gessard[1]) behauptet, daß das rote Produkt bei der Tyrosinasereaktion durch Metallsalze (Erdalkalien) schnell in schwarzes Melanin übergeführt wird. Bach[2]) betont auch, daß die Metallsalze lediglich die weitere Umwandlung der bereits entstandenen roten Cxydationsprodukte bewirken, ohne sich an dem primären Oxydationsprozeß, d. i. an der Sauerstoffaufnahme und Sauerstoffaktivierung zu beteiligen. Wir haben nun gesehen, daß Metallsalze, z. B. das Calciumchlorid und Magnesiumsulfat, sehr bald in der inaktiven Enzymlösung das Prämelanin bilden. Mithin wirken sie schon mit, entgegen der Bachschen Ansicht, bei der Bildung des ersten Farbstoffes. Da die meisten Metalle, bei geeigneter Konzentration, die Rolle des Aktivators spielen, so muß man wohl annehmen, daß es sich nicht um eine chemische Abstimmung zwischen Enzym und Ko-Enzym handelt, sondern wahrscheinlich um einen physikalischen Vorgang, vielleicht um eine Vergrößerung der Oberfläche des Enzyms durch die Salze, wodurch erst das

---

[1]) C. Gessard, Sur la tyrosinase. Compt. rend. 130, 1327. (1900.)
[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 43, 366. (1910.)

Digitized by Google

Enzym zur Entfaltung kommen kann. Jedenfalls ist erwiesen, daß die Salze zum Gelingen der Tyrosinasereaktion notwendig sind.

Aber noch eine zweite Aufgabe haben hierbei die Metallsalze. Sie aktivieren nicht nur die α-Tyrosinase, sondern sie bewirken auch, daß das Melanin „sichtbar" wird. Es ist anzunehmen, daß das Melaninmolekül zunächst in molekular disperser Verteilung im Reaktionsgemisch gelöst ist und deshalb farblos erscheint. Sind saure Phosphate zugegen, so bewirken sie eine physikalische Kondensation der Moleküle und es entsteht ein kolloidaler Zustand, der die rote Farbe des Prämelanins bestimmt. Chlorcalcium, Chlorbarium, Strontiumnitrat und Magnesiumsulfat wirken ähnlich, jedoch verursachen sie eine noch stärkere Kondensation, wodurch allmählich eine schwarzviolette Färbung auftritt. Cadmiumsulfat in schwacher Verdünnung erzeugt dieselben Phasen und liefert langsam gröber disperses blaues Melanin, das endlich als grobdisperses schwarzes Melanin in Flocken ausfällt. Zinksulfat gibt sofort das blaue Melanin. Die Farbe des Melanins ist also nur von dem jeweiligen Dispersitätsgrade, bedingt durch die Verschiedenartigkeit der Metalle, abhängig. In sauren Medien (z. B. bei Zusatz von primärem Kaliumsulfat) bleibt die rote Phase sehr lange bestehen, während alkalische Medien (Dikaliumphosphat) sehr schnell die schwarzviolette bis schwarze Stufe geben.

Daß es sich bei diesem Farbenspiel höchstwahrscheinlich um einen physikalischen Vorgang handelt, beweist noch folgendes Experiment. Hat man sich aus normalem Preßsaft mit Tyrosinlösung das rote Melanin dargestellt und kocht alsdann das Reaktionsgemisch auf, so schlägt die rote Farbe in Grünschwarz um. Offenbar hat hier eine physikalische Kondensation der Moleküle stattgefunden, denn eine Enzymreaktion ist dabei ausgeschlossen. Dieser Versuch steht in gewissem Widerspruch mit den Arbeiten Bachs[1]), der durch Aufkochen eine Entfärbung der Flüssigkeit beobachtete. Um Melanin zu bekommen, mußte er dann noch Peroxydase + Hydroperoxyd zusetzen. Läßt er jedoch die farblose Lösung ohne Zusatz längere Zeit stehen, so bildet sich auch Melanin, aber nur spärlich. Dieses

[1]) Diese Zeitschr. 60, 226.

Digitized by Google

Ergebnis würde schon meinen Befunden und der Erklärung durch eine kolloidchemische Reaktion näher kommen.

Die Farbenerscheinung hat eine Parallele bei dem kolloidalen Gold der Glasflüsse, das bekanntlich je nach der Stärke der Dispersion rot oder blau färbt (Szigmondy).

Wie bereits bekannt ist, nimmt Bach[1]) in der Tyrosinase ein Gemenge von zwei Enzymen an, eine Aminoacidase und eine Phenolase. Das erstere baut die Seitenkette des Tyrosins nach der Streckerschen Gleichung ab,

$$C_6H_4\langle{}^{OH}_{CH_2 \cdot CH \cdot NH_2 \cdot COOH} + H_2O = C_6H_4\langle{}^{OH}_{CH_2 \cdot CHO} + NH_3 + CO_2 + H_2,$$

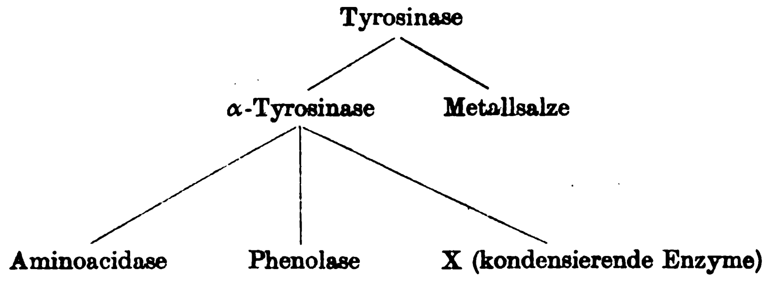
wobei der Wasserstoff durch einen Akzeptor gebunden wird. Dieser ist nach Bach nicht in der fertigen Tyrosinase vorhanden, sondern entsteht aus dem Enzym unter dem Einfluß des Sauerstoffs. Er wird abwechselnd durch den Wasserstoff des Wassers reduziert und durch den freien Sauerstoff wieder oxydiert, wahrscheinlich durch Vermittlung der Phenolase. Durch diese hydroklastische Oxydation ist das Tyrosin für die weitere Oxydation durch die Phenolase vorbereitet. Folpmers[2]) bestätigt Bachs Resultat mit einer anderen Tyrosinase, mit der aus dem Milchsafte von Euphorbia lathyris und findet, daß bei der zweiten Phase der Reaktion Sauerstoff in den Benzolkern eingeführt wird, worauf das abgespaltene Ammoniak wieder gebunden wird. Chodat und Schweizer bestreiten allerdings die Bachsche Ansicht über die Zerlegung der Tyrosinase in zwei Enzyme, beweisen aber einwandfrei den Abbau der Aminosäure in Aldehyd, Kohlensäure und Ammoniak. Schweizer[3]) betrachtet die Desaminierung als Oxydationswirkung. Jedenfalls steht fest, daß ein Enzym-, — Bach nennt es Aminoacidase — die Seitenkette des Tyrosins im Sinne der Streckerschen Gleichung abbaut. Ein zweites Enzym — die Phenolase — vermag Sauerstoff in den Benzolkern einzuführen. Nach unseren jetzigen Kenntnissen wäre die Tyrosinase nach folgendem Schema zu zerlegen:

[1]) loc. c.

[2]) Diese Zeitschr. 78, 180. 1917

[3]) Diese Zeitschr. 78, 37. 1917.

Digitized by Google



Den Reaktionsmechanismus müßte man sich demnach folgendermaßen vorstellen: Zuerst wirkt die Aminoacidase unter Aldehydbildung, dann oxydiert die Phenolase und führt eine Hydroxylgruppe (oder mehrere) in den Benzolkern ein. Ob hierbei die Metallsalze die beiden Enzyme aktivieren, muß erst noch erwiesen werden. Die darauffolgende Kondensation zum Melanin durch andere Enzyme der α-Tyrosinase — vielleicht spielt auch der von Bach mit seinen Tyrosinasepräparaten beobachtete interessante Reduktionsprozeß hierbei eine wichtige Rolle — geschieht jedenfalls unter Beihilfe der Metallsalze. Diese bewirken zum Schlusse auch die Sichtbarmachung des Melanins, indem sie den molekular-dispersen Stoff in Grade geringerer Dispersion überführen und dadurch das Farbenspiel hervorrufen.

Es sei mir auch an dieser Stelle gestattet, Herrn Willy Clauß für seine treue Beihilfe bestens zu danken.

Zusammenfassung.

1. Die Tyrosinasereaktion verläuft am besten in der Nähe des Neutralpunktes der Reaktionslösung, was auch schon Chodat und Zahorski gefunden haben.

2. Die Hydroxylionen und die Wasserstoffionen der Essig-, Milch- und Salzsäure hemmen die Tyrosinasereaktion.

3. Die Tyrosinase kann durch Dialyse in die inaktive α-Tyrosinase und Metallsalze zerlegt werden. Die α-Tyrosinase bedarf zur Entfaltung ihrer Tätigkeit eines Salzes.

4. Das Zink-, Cadmium- und Calciumion aktivierten von allen ausprobierten Metallen die α-Tyrosinase, die Fraktion I, am schnellsten. Sie übertrafen in ihrer Wirkung die Fraktion II und vergrößerten dadurch den natürlichen physiologischen Effekt.

5. Auch das Phosphorsäureanion ist ein starker Aktivator für die α-Tyrosinase.

Digitized by Google

6. Diese ist ein organischer Stoff, der erst bei 80° zerstört wird. Proteolytische Enzyme können ihn nicht zerlegen.

7. Die Tyrosinase ist nach dem jetzigen Standpunkte der Forschung ein Gemenge von Enzymen. Nach Bach, Chodat, Schweizer und Folpmers zerlegt zunächst die Aminoacidase das Tyrosin im Sinne der Streckerschen Gleichung, worauf die Phenolase ein Hydroxyl in den Benzolkern einführt. Hierauf müssen kondensierende Enzyme das Melaninmolekül aufbauen, wobei Metallsalze die Enzyme aktivieren.

8. Das Melanin verdankt den Metallsalzen sein charakteristisches Farbenspiel.

Digitized by Google

Über die Abhängigkeit von Hefewachstum und Hefengärung von physikalisch-chemischen Erscheinungen.

Von

Friedrich Boas.

(Aus dem botanischen Laboratorium der landwirtschaftlichen Hochschule Weihenstephan.)

(Eingegangen am 2. März 1920.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die Tatsache, daß Mikroorganismen bei einer ganz bestimmten Konzentration der Stickstoffquelle ein sogenanntes „Optimum“ des Wachstums oder der Gärung haben, ist eine sehr allgemein bekannte Erscheinung. Eine Erklärung oder der Versuch zu einer Deutung ist jedenfalls schwierig und bis jetzt in Hinsicht auf physikalisch-chemische Vorgänge kaum unternommen worden. Am besten sind die angedeuteten Verhältnisse bei wachsender und gärender Hefe zu beobachten. Es sei zur Erläuterung daher kurz folgender Versuch beschrieben:

50 ccm einer Dextroselösung (destill. Wasser 1000 ccm, Dextrose 150 g, ohne Nährsalze) wurde mit Ammonsulfat versetzt, so daß folgende Konzentrationen an Ammonsulfat vorhanden waren: 1,5, 1, ½, ¼, $^1/_8$, $^1/_{10}$, $^1/_{20}$, $^1/_{40}$, $^1/_{60}$, $^1/_{80}$ normal Diese Dextrose-Ammonsulfatlösung wurde mit 5 ccm dickbreiiger, 6 Tage alter, gewaschener Brauereiunterhefe versetzt und die entwichene Kohlensäure zu bestimmten Zeitpunkten durch Wägung ermittelt. Es ergaben sich folgende Verhältnisse:

Konzentration des Ammonsulfat	g CO_2 nach 2 Tagen	3 Tagen	4 Tagen
0,00	1,50	2,50	2,95
1,5 n	1,00	1,75	2,25
1,0 n	1,10	2,00	2,45
$^1/_2$ n	1,45	2,50	3,15
$^1/_4$ n	1,40	2,40	2,90
$^1/_8$ n	1,50	2,40	2,95
$^1/_{10}$ n	1,50	2,55	3,05
$^1/_{20}$ n	1,50	2,50	2,95
$^1/_{40}$ n	1,50	2,40	2,90
$^1/_{60}$ n	1,35	2,10	2,55
$^1/_{80}$ n	1,20	2,20	2,60

Digitized by Google

Aus dieser Übersicht ergibt sich:

1. Es besteht eine Zone maximaler Gärung bei der Ammonsulfatkonzentration von $^1/_2$—$^1/_{20}$ n.

2. Es sind 2 deutliche Minima der Gärung bei 1,5—1,0 n und von $^1/_{60}$ n abwärts vorhanden.

Diese Erscheinungen deuten auf physikalisch-chemische Vorgänge hin, analog wie wir sie bei den unregelmäßigen Reihen kennen. Es braucht nur angenommen zu werden, daß die Plasmamembran z. B. durch eine bestimmte Stickstoffkonzentration verdichtet (gefällt) oder gelockert wird, dann wird die Änderung der Gärleistung mehr oder weniger schon allein durch diese Annahme erklärt.

Ein viel deutlicheres Ergebnis wurde mit wachsender Hefe des folgenden Versuches erzielt: In 50 ccm einer Nährlösung folgender Zusammensetzung: 1000 ccm destilliertes Wasser, 150 g Saccharose, 0,75 g K_2HPO_4, 0,15 g $MgSO_4$, wurde der Gehalt an Ammonsulfat so gewechselt, daß er zwischen 2,4—0,03% schwankte. Die Einsaat war sehr gering, die Kolben mit 50 ccm der Nährlösung standen im Brutschrank bei 25° C. Es erfolgte das Wachstum sehr langsam, aber schon mit bloßem Auge waren deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen zu erkennen; diese Unterschiede gingen nicht mit der Konzentration der Ammonsulfatmenge parallel. Nach 21 Tagen waren folgende Mengen Kohlensäure abgegeben:

Konzentration des Ammonsulfat in %	Entwickelte CO_2 in g	
2,4%	**3,57**	Mittelwerte aus den stets sehr gut übereinstimmenden Wägungen von je 2 Parallelkolben
1,2%	3,25	
0,6%	**3,05**	
0,3%	3,07	
0,15%	**3,92**	
0,075%	3,22	
0,0375%	3,22	

Wir haben hier ein ausgesprochenes Minimum der Gärleistung bei 0,6—0,3% und zwei deutliche Maxima bei Gegenwart von 2,4 und 0,15% Ammonsulfat. Da die Minima mit der Ammonsulfatkonzentration nicht parallel gehen, und da von einem Stickstoffhunger bei einer Konzentration von 0,6—0,3% Ammonsulfat keine Rede sein kann, so müssen offenbar Wirkungen des Ammonsulfates auf die Plasmamembran (vielleicht auch bis zu

Digitized by Google

einem gewissen Grade Zellwand und auf den ganzen Stoffwechselverlauf) vorliegen, die auf eine Veränderung der Plasmakolloide und Plasmalipoide hindeuten, etwa im Sinne der unregelmäßigen Reihen und verwandter Vorgänge zwischen Kolloiden und Krystalloiden.

Die bis jetzt mitgeteilten Versuche wurden im Anschlusse an Pringsheims[1]) Hefenarbeit wiederholt. In großem Maßstabe treffen wir diese erwähnten unregelmäßigen Reihen bei Pringsheim; aus naheliegenden historischen Gründen hat Pringsheim seine Resultate nicht im obigen Sinne verwertet. Es soll daher der wertvolle Inhalt der Pringsheimschen Arbeit hier im Sinne der Kolloidchemie an der Hand einiger Kurven kurz erläutert werden.

Pringsheim verwendete folgende Nährlösung:

0,75 g K_2HPO_4, 0,1 g $MgSO_4$, Spuren von NaCl u. $FeSO_4$, 15% Rohrzucker.

Die Stickstoffkonzentration war von 10,27 g N bis 0,020 g N im Liter abgestuft. Die zu bestimmten Zeiten entwickelten CO_2-Mengen zeigten auffallende Maxima und Minima, die keineswegs mit der Stickstoffmenge auch nur annähernd parallel gingen. Die CO_2-Maxima und -Minima sind in den folgenden Kurven graphisch dargestellt und bedürfen keiner weiteren Erläuterung. Dabei ist es im allgemeinen gleichgültig, welchen Versuchstag man zur graphischen Darstellung wählt, das Kurvenbild bleibt in der Hauptsache unverändert. Dies sei an einigen Zahlenangaben veranschaulicht. Es beträgt z. B. bei der Hefe Frohberg (mit Asparagin als Stickstoffquelle) bei wechselndem Stickstoffgehalt die CO_2-Abgabe:

Versuchstag:		g N im Liter der Nährlösung					
		2,568	1,284	0,642	0,321	0,08	0,04
8	CO_2-Abgabe	1,6	2,8	4,0	0,4	6,4	13,2
16		12,8	14,8	19,2	7,6	22,0	25,2
32		28,8	30,4	33,2	18,0	36,0	38,0

Nach dieser kurzen Zahlenangabe liegt bei Verwendung von 0,321 g N im Liter ein ausgesprochenes Minimum, bei 0,04 g ein deutliches Maximum der CO_2-Abgabe. Diese Verhältnisse sind noch scharf am 99. Tag zu erkennen! Da bei Gegenwart von 0,321 g N im Liter noch kein Stickstoffmangel vorhanden sein

[1]) Pringsheim, diese Zeitschr. 3, 121 ff. 1907.

Digitized by Google

kann, so müssen andere als physiologische Gründe zur Erklärung herangezogen werden. In den folgenden Abb. 1—3 sind diese hier kurz geschilderten Tatsachen auf Grund der Pringsheimschen Arbeit graphisch dargestellt.

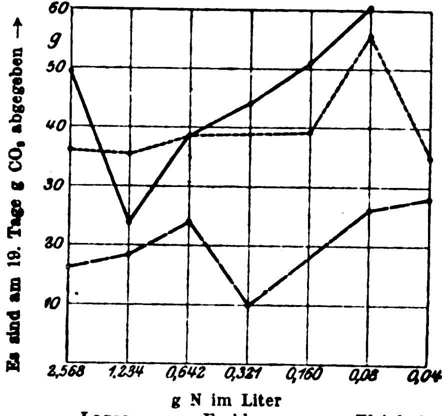


Abb. 1. Asparagin als Stickstoffquelle. Die CO_2-Werte entstammen dem 19. Versuchstag.

In den Kurven fallen je nach der Art der verwendeten Stickstoffquelle eine Reihe von Maxima und Minima der CO_2-Abgabe deutlich auf. So hat z. B. die verwendete Weinhefe drei Maxima mit Ammonsulfat als N-Quelle, nämlich das Hauptmaximum bei 1,2 g N im Liter und zwei Nebenmaxima je bei 0,321 und 0,08 g N im Liter; während die Hefe Logos und Frohberg mit der gleichen Stickstoffquelle nur zwei Maxima der CO_2-Abgabe aufweist. Entsprechend dem Vorhandensein von zwei bis drei Maxima finden sich auch ein bis drei Minima der Gärleistung. Von Wichtigkeit ist, daß z. B. das Hauptmaximum der Gärung der einzelnen Hefen nicht bei derselben Stickstoffkonzentration liegt. Dies deutet auf eine Artspezifität der Plasmamembran hin. Wählen wir z. B. Ammonsulfat als Stickstoffquelle, so liegt das Hauptmaximum der Hefe Frohberg bei einem Stickstoffgehalt von 0,04 g, bei der Logoshefe bei 0,08 g und bei der Weinhefe bei 1,2 g Stickstoff im Liter. Dies deutet, wie schon betont, auf eine Spezifität der Plasmamembran hin, die als Artcharakteristikum gelten kann.

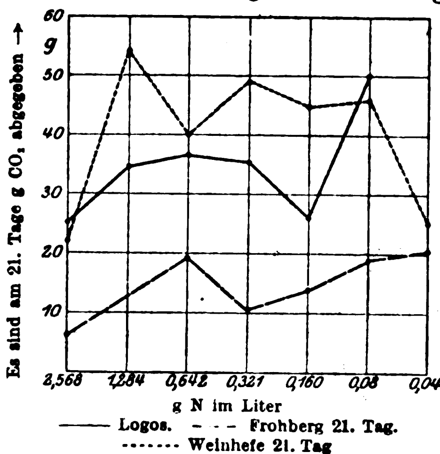
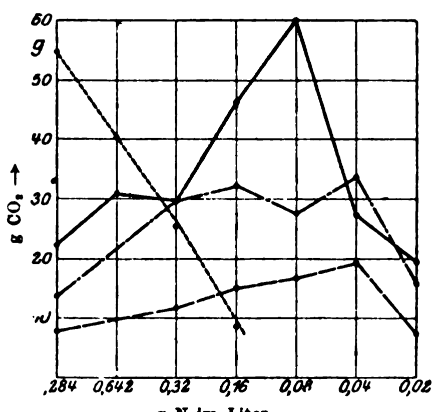


Abb. 2. Ammonsulfat als Stickstoffquelle. Die CO_2-Werte entstammen dem 21. Versuchstage.

Digitized by Google

Der Gedanke, daß der osmotische Druck der Lösungen hier eine Rolle spielen könnte, fällt weg, da aus den Konzentrationsverhältnissen ohne weiteres klar ist, daß der osmotische Druck als Erklärungsgrund nicht in Betracht kommt.

Sehr auffallend ist die Erscheinung, daß Melasseleucin sich völlig anders verhält als synthetisches Leucin. Mit synthetischem (racemischem) Leucin sind im Prinzip dieselben unregelmäßigen Reihen zu erkennen wie mit Asparagin oder Ammonsulfat. Dagegen liefert Melasseleucin keine Andeutung einer unregelmäßigen Reihe; es fällt die Gärleistung konstant mit abnehmender Stickstoffkonzentration so gleichmäßig, daß man bei der graphischen Darstellung eine gerade Linie erhält, wie die Abb. 3 zeigt. Dies ist sehr auffallend; da aber das untersuchte Gebiet (1,2 bis 0,16 g N im Liter) verhältnismäßig klein ist, so soll hieran vorerst keine weitere Erörterung geknüpft werden.



g N im Liter
——— Logos 22. Tag. – – – Frohberg 22. Tag. –·–·– Frohberg 65. Tag ······· Logos, Melasse 21. Tag.

Abb. 3. Synthetisches und Melasseleucin als Stickstoffquelle. Die CO_2-Werte der Hefe Logos entsprechen dem 22., die der Hefe Frohberg dem 65. und 22., die der Hefe Logos mit Melasseleucin dem 21. Versuchstage (Hefe Frohberg ist doppelt dargestellt.)

Es ist ferner sehr bezeichnend, daß sogar mit Pepton deutlich unregelmäßige Reihen beobachtet werden können; allerdings ist diese Erscheinung nur in den ersten Tagen der Gärung einwandfrei zu erkennen. Hefe Logos hat z. B. am 8. Versuchstage folgende deutliche Maxima der CO_2-Abgabe: a) bei 2,568 g Hauptmaximum, b) bei 0,321 g N und 0,08 g N im Liter zwei Nebenmaxima, dabei ist von den höheren Stickstoffkonzentrationen, die Pringsheim noch anwendete, abgesehen. Am 12. Versuchstage sind diese drei Charakterpunkte der Gärkurve bereits völlig verwischt, man muß daher bei Anwendung von Pepton sehr frühe Versuchsdaten benützen, um ein positives Ergebnis zu erhalten. Auch bei der Frohberghefe läßt sich z. B. am 12. Versuchstage ein scharfes Minimum der Gärung bei Gegenwart von 0,642 g N im Liter

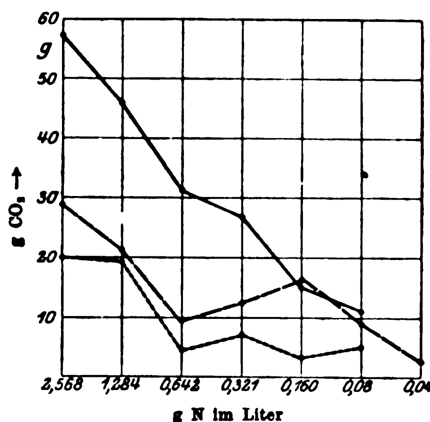
Digitized by Google

erkennen. Es sind z. B. am 12. Versuchstage entwickelt g CO_2 bei folgenden Stickstoffkonzentrationen:

g N im Liter:	5,14	2,568	1,284	0,642	0,321	0,160	0,08
g CO_2	36,0	27 2	21,4	9,2	1,44	16,4	9,20

Das Minimum bei 0,642 ist sehr scharf ausgeprägt, ist jedoch schon am 16. Versuchstag völlig verwischt. (Vgl. hierzu Abb. 4.)

Aus den Versuchen der Peptonreihe kann geschlossen werden, daß ganz bestimmte Aminosäuren oder noch stärker abgebaute Stickstoffverbindungen an der Plasmamembran zur Wirkung kommen.



······· Logos 8. Tag. ——— Logos (Pepton) 12. Tag. – – – Frohberg (Pepton) 12. Tag.

Abb. 4. Pepton als Stickstoffquelle Die CO_2-Werte entsprechen dem 8. und 12. Tage bei Hefe Logos, dem 12. Tage bei Hefe Frohberg.

Zur Erklärung dieser Erscheinungen wird angenommen, daß die Plasmamembran durch die Einwirkung der verschiedenen Stickstoffkonzentrationen etwa wie eine Lecithinmembran teils verdichtet teils aufgelockert wird; der Verdichtung entspricht langsames Eindringen des Zuckers, und demgemäß eine langsamere Gärung, der Auflockerung entspricht eine raschere Vergärung. Da bei Anwendung von Pepton im Prinzip ebenfalls die Erscheinung der unregelmäßigen Reihen beobachtet wird, so ist zu folgern, daß Pepton an der Plasmamembran in krystalloide Stickstoffverbindungen umgesetzt wird. Der baldigen Verwischung der unregelmäßigen Reihen bei Anwendung von Pepton ist zu entnehmen, daß aus Pepton noch Verbindungen entstehen, die gleichzeitig gegensätzlich wirken wie die zur Erklärung der unregelmäßigen Reihen angenommenen krystalloiden Verbindungen. Dadurch wird die Peptonwirkung bald verwischt.

Bemerkenswert sind die Gegensätze zwischen synthetischem und natürlichem Leucin. Ersterer ist membranaktiv, letzteres membranpassiv.

Digitized by Google

Untersuchungen über Säurebildung bei Pilzen und Hefen.

IV. Mitteilung.

Von

Friedrich Boas, Hans Langkammerer und **Hans Leberle.**

(Eingegangen am 2. März 1920.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

In unserer I. Mitteilung[1]) stellten wir den Verlauf der Säurebildung durch Unterhefe Weihenstephan mit Dextrose als Kohlenstoffquelle dar. Es erschien nunmehr geboten, unsere Untersuchungen auch auf die anderen wichtigeren Zuckerarten auszudehnen, demgemäß kommen in der vorliegenden Arbeit vergleichende Untersuchungen über das Säurebildungsvermögen mit Maltose, Galaktose, Lävulose, Dextrose und Saccharose zur Darstellung. Diese Ausdehnung auf die wichtigsten Zuckerarten war auch aus dem Grunde geboten, um feststellen zu können, inwieweit eine spezifische Zuckerwirkung zu erkennen sei.

Über das Verhalten vieler Hefenarten zu den einzelnen Zuckern liegen zahlreiche Angaben vor. Lindner[2]) hat im Vereine mit Saito umfangreiche Versuche angestellt und gefunden, daß z. B. alle Unterhefen mit Saccharose in mineralischer Nährlösung sehr schlecht, mit Dextrose und Lävulose mäßig und mit Maltose gut wuchsen. Diese qualitativen Befunde hat Henneberg[3]) dahin präzisiert, daß die für viele Hefen ungünstige sauere Rohrzucker-Asparaginlösung durch Zusatz von „Kalksalzen" ($CaCO_3$) oder Soda an Brauchbarkeit gewinnt. Pringsheim[4]) hat mit Saccharose in alkalischer Lösung je nach der verwendeten Konzentration der Stickstoffquelle z. T. starkes Wachstum erzielt, womit für alle derartigen Versuche

[1]) Boas und Leberle, diese Zeitschr. **90**, 75 ff. 1918.
[2]) Lindner und Saito, Wochenschr f. Brauerei **27**, 509. 1910.
[3]) Henneberg, Gärungsbakteriol. Praktikum 1909. S. 184.
[4]) Pringsheim, diese Zeitschr. **3**, 121 ff. 1907.

Digitized by Google

sowohl der **Einfluß** der Reaktion der Nährlösung wie derjenige der Konzentration der Stickstoffquelle festgelegt ist.

Trotzdem bestehen noch sehr viele Schwierigkeiten über den Verlauf des Hefewachstums, namentlich wenn man auch an die „Biosfrage“ denkt. Es scheint, daß ein Teil der merkwürdigen Wirkungen, welche mineralische Zuckerlösungen auf das Hefenwachstum ausüben, als **spezifische Zuckerwirkung** zu deuten ist. Auf die Möglichkeit einer spezifischen Zuckerwirkung ist bis jetzt kaum hingewiesen worden. Man findet in allen Arbeiten unter Verkennung der möglichen Verhältnisse stets den Ausdruck „Zucker“, womit meist Rohrzucker gemeint ist; aber daß die Resultate bei Anwendung eines anderen „Zuckers“ sich ändern könnten, ist nirgends zu bemerken, und doch muß auch mit einer Zucker-(Kohlenstoff)-Frage ebenso gerechnet werden wie mit einer Stickstofffrage. Letztere beherrscht z. B. bis heute einseitig das Biosproblem.

Auf diese spezifische Zuckerwirkung ist bis jetzt also noch kaum ausdrücklich hingewiesen worden. Die Möglichkeit einer Zuckerwirkung ist gar nicht in Betracht gezogen worden, so daß z. B. **Lindet**[1]) erst in jüngster Zeit angab, weinsaures Ammon werde von Hefe bei Gegenwart von Saccharose sehr schlecht verarbeitet. Richtiger heißt es: Saccharose wirkt auf Hefe ungünstig ein, infolgedessen findet nur langsames Wachstum und nur spurenweiser Verbrauch von weinsaurem Ammon statt. Auch bei der Behandlung der Biosfrage[2]) ist diese Seite des Problems bis jetzt sehr wenig diskutiert worden. Auch A. **Klöcker**[3]) macht in seiner neuesten Arbeit über die Assimilationsfähigkeit von 12 Hefen keinen Versuch, an die Möglichkeit einer spezifischen Zuckerwirkung zu denken.

Die vermutete spezifische Zuckerwirkung scheint auf zweierlei Weise sich geltend zu machen. Die einzelnen Zuckerarten dürften nämlich in verschiedenem Maße auf die Plasmamembran, teils verhärtend, teils auflockernd einwirken; teils dürften dann entsprechend Teilprozesse des Stoffwechsels und des Stoffaustausches qualitativ verschieden je nach der Zuckerart vor sich gehen.

---

[1]) **Lindet**, Bull. Assoc. des Chim. de sucre et distill. **35**, 232. 1917.

[2]) Siehe hierzu: **Naumann**, Zeitschr. f. technische Biologie **7**, 1ff. 1919 (Fortsetzung der Zeitschr. f. Gärungsphysiol.).

[3]) **Klöcker**, Compt. rend. laborat. Carlsberg **14**, 1—40. 1919.

Digitized by Google

Für die vermutete Wirkung der Zuckerarten z. B. auf die Plasmamembran ergibt sich folgende Zuckerreihe im Sinne steigender ungünstiger Wirkung auf die gesamte Wachstums- und Gärtätigkeit

Maltose → Dextrose (Galaktose) → Lävulose → Saccharose[1]).

Es stehen also Maltose und Saccharose sich als physiologische Antipoden gegenüber. Dextrose nähert sich der Maltose, während Lävulose und Saccharose sich wieder sehr nahe kommen. Diese Nichtberücksichtigung einer möglichen Zuckerwirkung hat jedenfalls dahin geführt, viele unklare Erscheinungen des Hefenwachstums einseitig als reine Stickstoffwirkungen aufzufassen. Es sei z. B. an die eben erwähnte Arbeit Lindets erinnert. Für die spezifische Zuckerwirkung auf die Plasmamembran sprechen folgende wichtige Beobachtungen:

1. Rohrzucker verhärtet nach Küster[2]) im Gegensatz zu anderen Plasmolyticis die Plasmamembran. Für die roten Blutkörperchen ist Rohrzucker nach Höber[3]) besonders schädlich, auch auf Muskeln wirkt er ungünstig.

2. Rohrzucker wirkt bei Aspergillus niger[4]) verzögernd auf die Konidienbildung und die Ausbildung vieler Enzyme. Hinsichtlich der Bildung löslicher Stärke durch Aspergillus niger läßt sich folgende Zuckerreihe im Sinne steigender Schnelligkeit der Stärkebildung aufstellen[5]):

Maltose — Dextrose — Lävulose — Saccharose.

Es läßt sich also auch hier die schon eingangs erwähnte Zuckerreihe erkennen.

Diese spezifische Zuckerwirkung wird natürlich durch eine Reihe sekundärer Erscheinungen teils verstärkt, teils vermindert. Verändert, d. h. abgeschwächt oder verstärkt wird diese Zuckerwirkung

[1]) Diese Reihe gilt natürlich nur insoweit, als die betreffenden Hefen (Organismen) die 4—5 Zuckerarten, wenn auch teilweise spurenweise, verarbeiten können.

[2]) E. Küster, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 27, 589. 1909; Zeitschr. f. Botan. 5, 689. 1910.

[3]) Höber, Physikalische Chemie der Zelle. S 242 und 407. 1914.

[4]) F. Boas, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 37, 57ff. 1919.

[5]) F. Boas, Beihefte botan. Centralbl. Abt. 1, 36, 135ff. 1919.

Digitized by Google

1. durch die Konzentration der angewendeten Stickstoffquelle,

2. durch die Reaktion der Nährlösung und

3. vermutlich durch Gewöhnung des Versuchsorganismus an bestimmte Zucker.

Diese Gesichtspunkte spielen alle eine mehr oder minder deutliche Rolle. Jedenfalls deuten sie an, daß hier ein Kapitel sehr komplizierter physiologischer und biochemischer Vorgänge vorliegt.

Inwieweit nunmehr eine spezifische Zuckerwirkung zu erkennen ist, sollen die folgenden Untersuchungen näher erläutern. Bei den folgenden Versuchen sind alle irgendwie wichtigen Angaben gemacht. Es finden sich verzeichnet die Werte der aktuellen und potentiellen Säuren, die Größe der Vergärung und der Inversion und die notwendigen Angaben über die Wachstumsverhältnisse. Zur Verwendung kamen fast ausnahmslos 50 ccm einer 5%igen Zuckerlösung mit 0,3% Stickstoffquelle, nämlich Asparagin oder Ammonsalzen. Die Temperatur betrug teils 23—24°, teils 17—19°. Die Größe der Einsaat schwankte in nicht weiten Grenzen und ist im einzelnen angegeben. Zur angewandten Untersuchungsmethodik sei folgendes bemerkt:

1. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde direkt gegen die gesättigte Kalomelelektrode bei 18° bei ruhender Wasserstoffatmosphäre gemessen. Die Gärflüssigkeiten wurden durch Filtrieren und halbstündiges Erwärmen auf 40° sorgfältig von Kohlensäure befreit.

2. Die potentielle Säure wurde durch Titrieren von 10 ccm Lösung mit $^{n}/_{10}$-NaOH gegen Phenolphthalein als Indicator festgestellt. Als Umschlagspunkt galt beginnende Rosafärbung ($= p_{H}$ ca. 8,3).

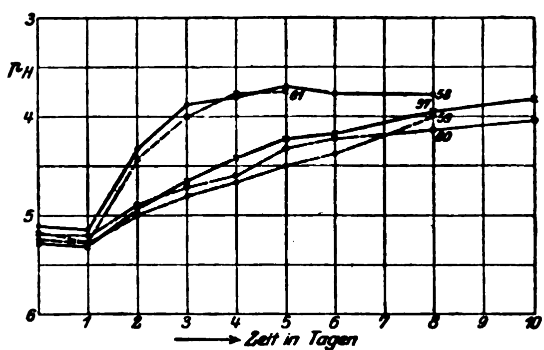
3. Der genauen Ermittlung des Vergärungsgrades der verwendeten Zucker stand die geringe zur Verfügung stehende Flüssigkeitsmenge im Wege. Das spezifische Gewicht wurde daher teils mit dem Sprengel-Ostwaldschen Pyknometer, teils durch Aräometer bestimmt. Daraus ließ sich der wirkliche und scheinbare Extrakt ermitteln. Außerdem wurde mit sehr gutem Erfolge das Zeißsche Eintauchrefraktometer verwendet, das einfachste Handhabung mit äußerster Materialersparnis verbindet. Es zeigt bekanntlich die Refraktion einer Flüssigkeit in Teilen einer will-

Digitized by Google

kürlichen Skala an; die Refraktion destillierten Wassers liegt bei 17,5° bei Teilstrich 18. Da 1% Zucker eine Erhöhung der Refraktion um ungefähr 4 Teilstriche, 1% Alkohol um etwa 1,6 Teilstriche bewirkt, so mußte die Refraktion einer endvergorenen 5%igen Zuckerlösung von etwa 35 auf etwa 19 Skalenteile sinken. Mit diesem Hilfsmittel konnten wir uns bequem über den Verlauf der Gärung unterrichten.

4. Zur Feststellung des Verbrauches von Asparagin verwendeten wir die Formoltitration von S. P. L. Sörensen[1]).

5. Den Verlauf der Rohrzuckerinversion sowie den unverbrauchten Zuckerrest in der Nährlösung stellten wir mit einem genauen Halbschattenapparat ($^1/_{10}$ Gradteilung) und bisweilen



57 Dextrose Ammontartrat. 58 Maltose Ammontartrat. 59 Saccharose Ammontartrat. 60 Lävulose Ammontartrat. 61 4% Maltose, 1% Dextrin Ammontartrat.
Abb. 1.

mit Hilfe der jodometrischen Zuckerbestimmung nach der von Bruhns[2]) modifizierten Lehmannschen Methode fest.

Wir beginnen die Darstellung unsrer Ergebnisse mit Versuchsreihe 57—61; bei den verwendeten 4 Zuckern: Dextrose, Lävulose, Saccharose und Maltose, diente 0,3%iges weinsaures Ammon als Stickstoffquelle; die Einsaat in die 50 ccm der Nährlösungen betrug etwa ½ Million Zellen. Das Resultat dieser Versuchsreihe ist in Tabelle I zusammengestellt. Die Abb. 1 erläutert die Verhältnisse nochmals.

Das Wachstum und die Gärung erlaubt die Zucker in folgende Reihe steigender Brauchbarkeit anzuordnen:

Saccharose — Lävulose — Dextrose — Maltose.

1) Siehe diese Zeitschr. 7, 45. 1908.

2) Chem.-Ztg. 42, 609. 1918.

Digitized by Google

Tabelle I.

Versuch 57—61. Beginn 30. III. 19. Zucker-Ammontartrat-Hefe.

57 : 5 % Dextrose 0,3 % Ammontartrat, 0,25 % KH_2PO_4, 0,15 % $MgSO_4$.
58 : 5 % Maltose 0,3 % „ 0,25 % KH_2PO_4, 0,15 % $MgSO_4$.
59 : 5 % Saccharose 0,3 % „ 0,25 % KH_2PO_4, 0,15 % $MgSO_4$.
60 : 5 % Lävulose 0,3 % „ 0,25 % KH_2PO_4, 0,15 % $MgSO_4$.
61 : 4 % Maltose, 1 % Dextrin 0,3 % „ 0,25 % KH_2PO_4, 0,15 % $MgSO_4$.
Einsaat ca. 500 000 Zellen

P_H		57	58	59	60	61
Ausgangslösung	30. III.	5,28	5,11	5,25	5,18	5,15
n. 24 h Zimmertemp.,	31. III.	5,32	5,15	5,29	5,20	5,29
dann im Brutschrank	1. IV.	4,93	4,33 [1]	5,00	4,91	4,42 [1]
	2. IV.	4,64	3,88 [1]	4,80	4,71	3,95 [1]
	3. IV.	4,41	3,80	4,66	4,59	3,75
	4. IV.	4,21	3,69	4,49	4,32	3,73
	5. IV.	4,16	3,76	4,37	4,20	—
	7. IV.	3,93	3,76	4,00	4,11	—
	10. IV.	3,78	—	—	4,00	—
Potentielle Säure ccm n/10 f. 10 ccm (Ind. Phenolphthalein)						
	30. III.	2,04	2,12	2,00	2,06	2,16
	31. III.	2,00	2,05	2,00	2,02	2,22
	1. IV.	2,10	2,58	2,10	2,22	2,70
	2. IV.	2,43	3,49	2,25	2,55	3,28
	3. IV.	2,50	3,66	2,40	2,45	3,45
	4. IV.	2,80	3,87	2,56	3,27	3,27
	5. IV.	2,60	4,38	2,82	3,10	—
	7. IV.	3,90	3,90	3,80	3,40	—
	10. IV.	4,00	—	—	3,73	—
Refraktion:						
Skalenteile bei 17,5° C	Ausgang	35,3	35,05	35,7	35,55	—
	am 5. IV.	30,65	20,75	33,0	30,9	—
Vergärungsgrad:						
	scheinbar	35%	83%	12%	32%	—
	wirklich	28%	68%	10%	26%	—

Starke Gärung tritt nur in Versuch 58 (Maltose) auf; die erreichte maximale aktuelle Säure deckt sich mit späteren Versuchen und ist schon am 5. Versuchstage vorhanden, sie wird mit Dextrose annähernd erst am 11. Tage erreicht; die beiden anderen Zucker wirken sehr ungünstig auf die Hefe (Plasmamembran) ein, infolgedessen ist Wachstum, Säurebildung und Gärung sehr gering trotz Vorhandenseins einer guten Stickstoffquelle.

Charakteristisch ist für alle Versuche, daß wenige Stunden nach der Impfung die aktuelle und potentielle Säure gegenüber

[1]) Deutlich stärkere Gärung als bei den anderen Kolben des gleichen Tages.

der Kontrollösung erkennbar geringer ist. Dies ist aus der Abb. 1 gut zu ersehen. In unseren früheren Versuchen fiel uns dieser Knick der Kurve nicht auf, weil wir erst nach mehreren Tagen die erste Messung vornahmen. Im Prinzip wurde diese Beobachtung schon von Schjerning[1]) gemacht. Wir sind nicht weiter auf diese kurze Zeit andauernde Abnahme der Säure eingegangen.

Der Versuch 61, wo nur 4% Maltose neben 1% Dextrin vorhanden war, kann als Bestätigung unserer Maltoseversuche dienen, er verläuft vollkommen parallel mit Versuch 58.

Aus der gesamten Versuchsreihe ist eine starke spezifische Zuckerwirkung, wie sie in mineralischen Lösungen mit krystalloiden Stickstoffverbindungen sehr häufig vorkommt, mit aller Schärfe zu erkennen, dies zeigt auch der Verlauf der Refraktion bzw. die Größe des Vergärungsgrades. Trotzdem besteht immerhin die Möglichkeit, daß das Ammontartrat an der schlechten Vergärung der Zucker Lävulose, Dextrose und Saccharose schuld sein könnte, daß also trotzdem eine Stickstoff- und keine Zuckerwirkung vorliege. Deshalb wurden in Versuchsreihe 62—68 und 73—74 die noch notwendigen Ergänzungen mit anderen Stickstoffquellen, nämlich mit bernsteinsaurem Ammon und Asparagin neben Ammontartrat ausgeführt. Versuchsreihe 62—68 bringt die mit Ammontartrat, Ammonsuccinat und Asparagin unter sonst gleichen Bedingungen erhaltenen Resultate. In Versuch 68 wurden gleiche Teile von Saccharose und Maltose mit weinsaurem Ammon gemischt, um auch feststellen zu können, ob und wie Saccharose sich neben Maltose bemerkbar macht.

Versuch-Nr.	Wachstum	Aussehen und Inhalt der Zellen
62. (Sacch. Weins. Am.)	Schwach	Große Zellen, wenig Sproßverbände, viele Granula, nur Spuren von Glykogen.
63. (Sacch. Bernsteins. Am.)	Schwach	Wie Versuch 62.
64. (Sacch. Asparagin)	Etwas besser	Kleinere Zellen, viel Sproßverbände, viele Granula, fast kein Glykogen, viele Involutionsformen.
65. (Malt. Weins. Am.)	Stark	Große Zellen, wenig Sproßverbände, keine Granula viel Glykogen.
66. (Malt. Bernsteins. Am.)		

[1]) Schjerning, Compt. rend. d. trav. du Labor. de Carlsberg 9, 237. 1913.

Digitized by Google

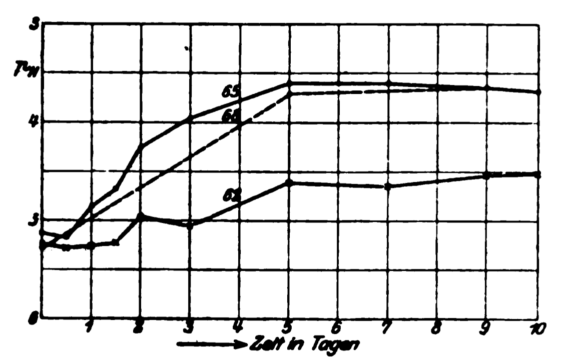
Versuch-Nr.	Wachstum	Aussehen und Inhalt der Zellen
67. (Malt. Asparagin)	Stark	Torulöse Sproßverbände, keine Granula, viel Glykogen.
68. = 62 + 65	Stark	Viel Glykogen, mäßig Granula.

Die schädliche Wirkung der Saccharose macht sich morphologisch und biochemisch in dem Auftreten vieler Granula als Zellinhalt dem fast völligen Fehlen von Glykogen und dem geringen Wachstum bemerkbar. Es ist, als ob die Zellen vorzeitig gealtert wären (Auftreten der Granula, Involutionsformen), bei Verwendung von Maltose dagegen sehen die Zellen gesund und leistungsfähig aus und sind reich an Glykogen. Maltose wirkt also gegensätzlich wie die Saccharose. Unter den gewählten Versuchsbedingungen fällt also unabhängig von der Stickstoffquelle der Stoffwechsel der Hefe, soweit die Granula- und Glykogenbildung in Betracht kommt, bei Gegenwart von Saccharose qualitativ anders aus als mit Maltose. Die entgiftende Wirkung der Maltose der Saccharose gegenüber ist aus Versuch 68 zu ersehen.

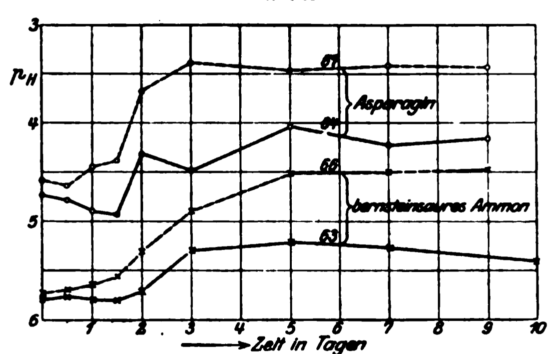
Die Resultate dieser Reihe decken sich vollkommen mit denen der Reihe 57—61. Es wird Saccharose unabhängig von der Stickstoffquelle, wie die Säure- und Refraktionswerte zeigen, kaum vergoren, hingegen Maltose sehr stark, die Maltose ist am Schluß des Versuches zu 90%, die Saccharose zu 5% vergoren (scheinbarer Vergärungsgrad). Von besonderer Wichtigkeit ist, daß Saccharose neben Maltose kaum einen schädlichen Einfluß ausübt, wie die Refraktion (und die Säuregrade) zeigen; höchstens ist eine anfängliche Verlangsamung des Wachstums in geringem Maße erkennbar. Die schädliche Wirkung der Saccharose wird also durch Maltose aufgehoben oder jedenfalls sehr stark vermindert. Dies ist also ein deutlicher Beweis für spezifische Zuckerwirkung (Versuch 68, vgl. hierzu Versuche 77 und 79).

Der Verlauf der Säurebildung der Versuchsreihe 62—68 ist in Abb 2 und 3, soweit die Werte der aktuellen Säure, und in Abb. 4, soweit die Werte der potentiellen Säure in Betracht kommen, graphisch dargestellt. Die besonders starke Säurebildung (potentielle Säure) des Versuches 66 (Maltose, bernsteins. Ammon) fällt besonders auf.

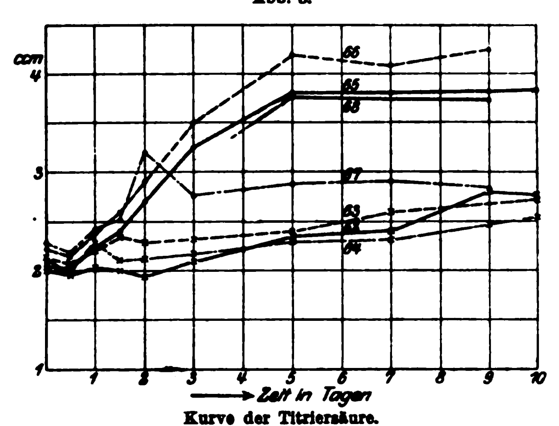
Digitized by Google



62 Saccharose weins. Ammon. 65 Maltose weins. Ammon. 68 Mischung von 62 + 65 zu gleichen Teilen.
Abb. 2.



63 Saccharose bernsteinsaures Ammon. 64 Saccharose Asparagin. 66 Maltose bernsteinsaures Ammon. 67 Maltose Asparagin.
Abb. 3.



Kurve der Titriersäure.
62 Saccharose weinsaures Ammon. 63 Saccharose bernsteinsaures Ammon. 64 Saccharose Asparagin. 65 Maltose weinsaures Ammon. 66 Maltose bernsteinsaures Ammon. 67 Maltose Asparagin. 68 Gleiche Teile von 62 + 65 gemischt.
Abb. 4.

Digitized by Google

Die während des Wachstums erzeugte gesamte maximale Wasserstoffionenbildung beträgt bei Anwendung von

62. Sacchar. weins. Am 27×10^{-6}	63. Sacch. bernsteins. Am. 9×10^{-6}
64. Sacchar. Asparag. 75×10^{-6}	65. Maltose weins. Am. 244×10^{-6}
66. Malt. bernsteins. Am. 31×10^{-6}	67. Maltose Asparagin. 381×10^{-6}

Die Säurebildung ist also bei Verwendung von bernsteinsaurem Ammon am geringsten, obwohl z. B. in Versuch 64 doch weitgehende Vergärung der Maltose stattgefunden hat; am stärksten ist die Bildung aktueller Säure mit Asparagin.

Von besonderem Interesse für den Nachweis der spezifischen Zuckerwirkung ist das mikroskopische Bild der Hefen dieser Versuchsreihe am 5. Versuchstage. Hierüber klärt die folgende Übersicht auf.

Die weiteren Zahlenbelege für diese Versuchsreihe sind aus der Tabelle II zu ersehen.

Dasselbe Resultat wie der vorstehende Versuch ergaben die Versuche 73 und 74 mit Asparagin als Stickstoffquelle. Es kam uns hier darauf an, quantitativ mit Hilfe der Formoltitration den Stickstoffverbrauch zu bestimmen, von der Wiedergabe der Säurewerte kann abgesehen werden. Es sind, wie die folgende Tabelle zeigt, am 10. Versuchstage verbraucht bei

Gegenwart von Maltose 88 mg Asparagin } auf 100 ccm
„ „ Saccharose 34 „ „ } umgerechnet.

Die Maltoselösung ist nahezu endvergoren, die Saccharose hat nicht gegoren.

Die Refraktions- und Formolwerte sind die folgenden:

Vers. 73: 5% Saccharose, 0,3% Asparagin, 0,15% $MgSO_4$, 0,25% KH_2PO_4,
„ 74: 5% Maltose, 0,3% „ 0,15% $MgSO_4$, 0,25% KH_2PO_4.

	Refraktion bei 17,5° C		Formoltitration: mg Asparag. auf 100 ccm	
Versuchsdauer:	Vers. 73	Vers. 74	Vers. 73	Vers. 74
16. VI. Kontrollösung (Beginn)	—	—	331	325
18. VI.	34,3	34,0	301	292
20. VI.	33,7	29,2	307	290
23. VI.	33,8	25,45	306	267
25. VI.	33,4	21,1	297	237
18. VII.	23,55	22,55	232	276

Digitized by Google

Tabelle II.

Versuch 62—68. Beginn 14. V. 19.

Saccharose, Maltose > Bierhefe — versch. Stickstoffquellen.

62 : 5% Saccharose 0,8% weins. Ammon 0,25% KH_2PO_4, 0,15% $MgSO_4$.
63 : 5% „ 0,8% bernst. „ 0,25% KH_2PO_4, 0,15% $MgSO_4$.
64 : 5% „ 0,8% Asparagin 0,25% KH_2PO_4, 0,15% $MgSO_4$.
65 : 5% Maltose 0,8% weins. Ammon 0,25% KH_2PO_4, 0,15% $MgSO_4$ (gelblich).
66 : 5% „ 0,8% bernst. „ 0,25% KH_2PO_4, 0,15% $MgSO_4$ (bräunlich).
67 : 5% „ 0,8% Asparagin 0,25% KH_2PO_4, 0,15% $MgSO_4$.
68 : Mischung von 62 + 65 zu gleichen Teilen.

Einsaat ca. 500000 Zellen.

p_H.	62	63	64	65	66	67	68
Ausgangslösung							
14. V. vorm.	5,24	5,79	4,74	5,14	5,74	4,59	5,25
14. V. nachm.	5,28	5,77	4,78	5,18	5,70	4,64	—
15. V. vorm.	5,26	5,80	4,90	4,87	5,65	4,45	—
15. V. nachm.	5,23	5,80	4,93	4,68	5,57	4,38	—
16. V. vorm.	4,96	5,72	4,32	4,25	5,31	3,68	—
17. V. „	5,06	5,55	4,49	3,95	4,90	3,39	—
19. V. „	4,61	5,46	4,03	3,60	4,51	3,46	3,71
21. V. „	4,64	5,53	4,23	3,60	4,51	3,42	—
23. V. „	4,53	—	4,17	3,65	4,48	3,44	3,65
28. V. „	—	5,35	—	3,81	—	—	—
30. V. „	4,48	—	5,35	3,86	—	—	—
Titriersäure							
14. V. vorm.	2,00	2,13	2,12	2,05	2,22	2,28	2,05
14. V. nachm.	1,95	2,06	1,98	2,02	2,15	2,18	—
15. V. vorm.	2,03	2,19	2,28	2,20	2,38	2,40	—
15. V. nachm.	2,00	2,34	2,10	2,40	2,59	2,51	—
16. V. vorm.	1,94	2,28	2,12	2,70	2,90	3,20	—
17. V. „	2,08	2,31	2,17	3,25	3,50	2,75	—
19. V. „	2,35	2,39	2,29	3,81	4,20	2,88	3,77
21. V. „	2,40	2,60	2,31	3,80	4,09	2,91	—
23. V. „	2,80	—	2,47	3,80	4,25	2,83	3,73
28. V. „	—	2,89	—	3,81	—	—	—
30. V. „	2,55	—	2,93	3,86	—	—	—
Refraktion bei 17,5° C							
21. V. Skalenteile	37,45	36,6	36,4	22,5	22,2	22,2	—
23. V. Skalenteile	35,6	—	36,7	21,97	22,0	21,8	21,9

(65—68:) Nahezu endvergoren

Ausgangsrefraktion 62—68 ca. 36,0 Skalenteile

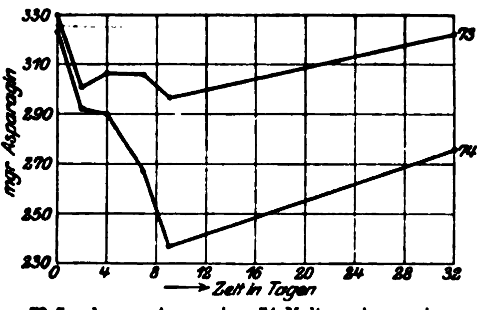
Wachstum und Gärungsverlauf

	62	63	64	65—68
14. V.	Schwaches Wachstum ohne CO_2-Entwicklung			
15. V. CO_2:	0	Spur	Spur	Wachstum und CO_2-Entwicklung stark
19. V. CO_2:	Spur	Spur	deutlich	Wachstum und CO_2-Abgabe sehr stark
21. V.	CO_2-Entwickl. schwach, Wachstum mäßig			Gärung fast beendet, Wachstum stark

Digitized by Google

Aus diesen Zahlen geht der Asparaginverbrauch deutlich hervor; nach langer Versuchsdauer steigt der Gehalt an Formolstickstoff der Nährlösung wieder beträchtlich an, als Folge von Abbauerscheinungen. Diese charakteristischen Verhältnisse sind in Abb. 5 für die beiden Zucker graphisch dargestellt.

Aus den bis jetzt mitgeteilten Versuchen ist der durchaus **überwiegende Einfluß der Kohlenstoffquelle auf Wachstums- und Gärverlauf** als erwiesen zu betrachten. Die sämtlichen verwendeten Stickstoffquellen werden zur Eiweißbildung mit Leichtigkeit verbraucht, wenn eine geeignete Kohlenstoffquelle vorhanden ist. Da nun z. B. Dextrose weniger brauchbar ist als Maltose, so werden wir bei der Verwendung von Chlorammon als Stickstoffquelle, wenn wir die Säurebildung als Maßstab der Gärung und des Wachstums betrachten, mit Dextrose eine geringere Wasserstoffionenkonzentration finden müssen als mit Maltose. Dies zeigt sehr schön Versuch 72 im Vergleich mit Versuch 4 und 8[1]). Mit Dextrose-Chlorammon erhielten wir seinerzeit ein p_H von 2,34—3,14, mit Maltose-Chlorammon ein p_H von 2,55. In Versuch 4 und 8 war Wachstum und Gärung träge, in Versuch 72 waren beide stark. Es seien die wichtigsten Angaben in der folgenden Tabelle zusammengestellt:



73 Saccharose Asparagin. 74 Maltose Asparagin.
Abb. 5.

Versuch 72: 5% Maltose; 0,3% NH_4Cl. Nährsalze wie stets.

	p_H	Titration	Refraktion
Ausgangslösung	4,20	2,18	35,6
Nach 1 Tag	2,87	2,26	31,6
„ 2 Tagen	2,69	2,80	29,0
„ 3 „	2 62	3,05	26,7
„ 4 „	2,55	3,45	23,2
„ 5 „	2,55	33,5	22,7

Die Zellen sind durchaus normal, vakuolenarm, mit nur wenigen Granula versehen; es finden sich viel Glykogen, abnorme Zellen fehlen.

[1]) Siehe diese Zeitschr. 90, 92. 1918.

Digitized by Google

Die bis jetzt mitgeteilten Versuche wurden mit Unterhefe Weihenstephan durchgeführt.

Diese Hefe kommt als Betriebshefe stets mit Maltose, Dextrose, Lävulose und Saccharose in Berührung. Wenn nun in den obigen Versuchen die einzelnen Zucker in sehr verschiedenem Maße in künstlichen Nährlösungen verarbeitet werden, so kann nier von einer Gewöhnung kaum eine Rede sein, da in den Würzen alle Zucker nebeneinander vorkommen[1]). Es spricht also jeder Versuch für eine spezifische Zuckerwirkung.

Die Möglichkeit des Einflusses der Gewöhnung an bestimmte Zucker kommt vielleicht in dem Versuche mit der Weinhefe Steinberg I[2]) zur Geltung Diese Hefe kam bis zur Versuchsanstellung niemals mit Maltose und Saccharose in Berührung. Es ist daher zu erwarten, daß sie auch mit Maltose langsam gären wird. Diese Erwartung ist voll bestätigt, aber es muß betont werden, daß die Einsaat nur etwa 150 000 Zellen gegen sonst etwa 500 000 betrug. Es ist also auch von dieser Seite her die langsamere Gärung erklärt. Es wurden folgende 3 Versuchsreihen ausgeführt:

Vers. 75: Saccharose 5,0%, Asparagin 0,3, Nährsalze
„ 76: Maltose 5,0%, „ 0,3 „
„ 77: Saccharose 2,5% + Maltose 2,5%, sonst wie 75 u. 76
} Einsaat ca. 160 000 Zellen

Die Resultate sind in folgender Tabelle dargestellt:

	Vers. 75	Vers. 76	Vers. 77
p_H nach	4,75 Kontrolle	4,65 Kontrolle	4,66 Kontrolle
2 Tagen	4,49	4,23	4,29
5 „	4,49	4,23	4,29
8 „	4,78	4,15	4,28
15 „	4,69	3,69	3,78

Die Refraktions- und Polarisationswerte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Refraktion	Vers. 5	Vers. 76	Vers. 77
Ausgangslösung	35,8	35,4	35,6
2. Tag	36,0	35,7	35,8
5. „	36,0	34,6	35,2
8. „	36,3	35,4	35,9
18. „	38,1	25,9	34,0
22. „	—	—	32,9

[1]) Wenn auch in sehr ungleichen Mengenverhältnissen.

[2]) Wurde uns von Herrn Dr. von Wahl - Augustenberg (Baden) in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt.

Digitized by Google

Polarisation (im 200-mm-Rohr)	Vers. 75	Vers. 76	Vers. 77
Ausgangslösung	+6,20	+12,96	+10,20
Drehung am 2. Tag	5,82	13,00	9,22
5. „	5,82	12,26	6,70
8. „	4,80	7,38	8,00
15. „	3,90	4,16	5,26

Es wird also hier sehr deutlich Maltose vergoren, wie Säurebildung, Refraktion und Polarisation zeigen; Saccharose wird wohl invertiert, aber nicht vergoren, und das Gemisch Maltose-Saccharose wird hier langsam vergoren. Dies wird noch durch die folgenden spezifischen Gewichte bewiesen.

Die spezifischen Gewichte des Versuches 75—77 sind folgende:

	Vers. 75	Vers. 76	Vers. 77
Ausgangslösung	1,0271	1,0224	1,0227
2. Tag	1,0230	1,0225	1,0222
5. „	1,0232	1,0210	1,0221
8. „	1,0235	1,0225	1,0235
15. „	1,0256	1,0081	1,0194

Die Weinhefe hat also nur Maltose und das Gemisch Maltose-Saccharose vergoren. Saccharose für sich wurde mit einer Inversionskonstante $k = 0{,}000\,013$ invertiert aber nicht vergoren. Inversion bei langsamem Wachstum wurde auch bei der Bierhefe mit sehr geringer Gärung beobachtet. Es ist daher zweckmäßig, zum besseren Vergleiche nochmals eine analoge Versuchsreihe mit der Hefe Weihenstephan hier anzuschließen. Diese Serie zeigt auch die gute Reproduzierbarkeit der Werte.

Bevor die einzelnen Werte angeführt werden, muß noch angegeben werden, daß das langsame Wachstum der Bier- und Weinhefe z. B. in Saccharose nicht auf Kosten des geringen Stickstoffgehaltes[1]) der Saccharose gehen kann. Denn wenn wir die Zucker nach ihrem natürlichen Stickstoffgehalte ordnen, so erhalten wir folgende Reihe steigenden Stickstoffgehaltes:

Dextrose — Saccharose — Maltose;

die Anordnung der Zucker nach der Wachstums- und Gärleistung der Hefen ist aber diese:

Saccharose — Dextrose — Maltose.

[1]) Über den Stickstoffgehalt der „reinsten" Präparate des Handels siehe: Lindner und Wüst, Wochenschr. f. Brauerei 1913, Nr. 36. Maltose „Kahlbaum" enthält ca. 0,04% Stickstoff. — Klöcker (Compt. rend. laborat. Carlsberg 14, 1919) gibt für Maltose einen Stickstoffgehalt von 0,014%, umkrystallisiert von 0,0027% an).

Digitized by Google

Es kann also der **natürliche Stickstoffgehalt der Zucker nicht zur Erklärung herangezogen werden**, so daß die Zuckerwirkung als solche bestehen bleibt.

Die Vergleichsversuche mit Bierhefe zur Weinhefereihe sind folgende:

Vers. 77a:	Saccharose 5%	0,3% Asparagin
78:	Maltose 5%	0,15% $MgSO_4$.
79:	Sacharose + Maltose je 2,5%	0,25 KH_2PO_4
		Einsaat ca. 160 000 Zellen

Die Säuregrade sind in der folgenden Tabelle vereinigt:

	Vers. 77a	Vers. 78	Vers. 79
Ausgangslösung p_H	4,64	4,74	4,76
Nach 2 Tagen	4,59	4,62	4,62
„ 3 „	4,52	4,13	4,44
„ 4 „	4,39	3,70	4,28
„ 5 „	4,38	3,55	4,17
„ 7 „	4,39	3,60	3,94
„ 9 „	4,31	3,72	3,80
„ 12 „	4,46	3,50	36,1
„ 14 „	—	3,65	3,67

Die Refraktion ergab folgende Werte:

	Vers. 77a	Vers. 78	Vers. 79
Ausganglösung	35,7	34,7	34,8
Nach 2 Tagen	35,65	34,3	34,2
„ 3 „	35,60	32,5	33,1
„ 4 „	35,60	29,0	31,4
„ 5 „	35,70	27,3	30,7
„ 7 „	35,70	25,2	28,4
„ 9 „	35,9	23,1	25,4
„ 12 „	36,0	23,5	22,2
„ 14 „	36,0	22,4	21,5
„ 33 „	36,3	21,0	20,5

Die Wachstumsverhältnisse sind die folgenden, nach:

		Vers. 77a	Vers. 78	Vers. 79
2 Tagen	Wachstum	Spur	stark	stark
	CO_2-Entwicklung	keine	deutlich	schwach
4 „	Wachstum	Spur	sehr stark	stark
	CO_2-Entwicklung	keine	„ „	„
7 „	Wachstum	gering	„ „	„
	CO_2-Entwicklung	keine	„ „	„
12	Wachstum	gering	„ „	„
	CO_2-Entwicklung	keine	„ „	„

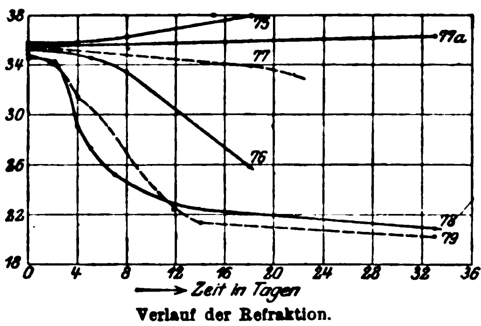
Digitized by Google

Es ist nun noch der Inversionsverlauf zu skizzieren:

Polarisation (200-mm-Rohr)

	Vers. 77a	Vers. 78	Vers. 79
Ausgangslösung	+ 6,40	+ 12,48	+ 12,88
Drehung nach 2 Tagen	+ 4,92	+ 12,18	+ 12,16
„ „ 3 „	+ 2,12	+ 10,52	+ 11,18
„ „ 4 „	− 0,20	+ 7,18	+ 9,84
„ „ 5 „	− 1,48	+ 6,08	+ 9,14
„ „ 12 „	− 2,20	+ 2,18	+ 1,32
„ „ 32 „	− 2,36	+ 0,94	+ 0,36

Es wird also mit der Bierhefe (Versuch 77a) im Vergleich zur Weinhefe (Versuch 75) die Inversion viel schneller vollzogen. Aus Refraktion, Polarisation und Säurebildung ergibt sich, daß in der Mischung Maltose-Saccharose ein Anfangsstadium einer gewissen Hemmung durch die Saccharose zu erkennen ist, daß aber nach einer gewissen Inkubationszeit die Gärung sehr rasch und stark einsetzt und denselben Wert wie bei der Maltose erreicht, wie aus der beigegebenen Säurebildungskurve ersichtlich ist. Gerade diese beiden Mischungsversuche lassen sehr deutlich die spezifische Zuckerwirkung, hier Saccharosewirkung, erkennen.



Verlauf der Refraktion.

75 Saccharose Asparagin }
76 Maltose Asparagin } Weinhefe Steinberg 1
77 Gleiche Teile von 75 u. 76 }
77a Saccharose Asparagin }
78 Maltose Asparagin } Unterhefe Weihenstephan
79 Gleiche Teile von 77a u. 78 }

Abb. 6.

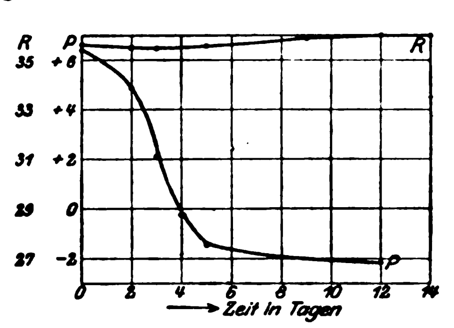
Konnte aus den Bierhefeversuchen nicht mit Sicherheit ein Einfluß der Gewöhnung angenommen werden, so ist es möglich, aus der langsamen Gärung der Maltose mit Weinhefe einen Gewöhnungseinfluß neben der Zuckerwirkung zu erkennen. Denn die Weinhefe kam nie mit Maltose und Saccharose in Berührung bis zu der Versuchsanstellung. Infolgedessen wird die Maltose langsamer vergoren und die Saccharose[1]) viel langsamer invertiert

[1]) Ob die Inversion nicht zum größten Teile in Versuch 75 auf Kosten der (H˙) zu setzen ist, ist nicht weiter verfolgt worden. In diesem Falle wäre hier der Einfluß der Gewöhnung geradezu in idealer Weise erwiesen.

Digitized by Google

als bei der Bierhefe, die stets mit diesen Zuckern Berührung hatte. Es ist also hier neben der spezifischen Zuckerwirkung deutlich der Einfluß der Gewöhnung zu erkennen.

Sehr deutlich treten die einzelnen biochemischen Leistungen der beiden Hefen auf der graphischen Übersicht der Abb. 6 hervor. Namentlich der Verlauf des Zuckerverbrauches der Zuckergemische ist sehr charakteristisch; in Versuch 79 ist die anfängliche Hemmung durch Saccharose nur gering und geht sogar rasch in eine erkennbare Förderung des Gärverlaufes über. In Versuch 77 dauert die anfängliche Saccharosewirkung länger. Der Nichtverbrauch der Saccharose ist in beiden dargestellten Fällen deutlich.



Verlauf der Refraktion (R = Zuckerverbrauch) und der Inversion P (Polarisation) in Versuch 77a (Saccharose Asparagin).
Abb. 7.

Die Schnelligkeit der Saccharoseinversion durch Unterhefe Weihenstephan zeigt die Polarisationsabbildung 7. Zum Vergleiche ist nochmal mit die Refraktionskurve dargestellt. Gärung tritt in der Versuchszeit nicht ein, der Zuckerverbrauch zu Assimilationszwecken ist nicht feststellbar.

Versuche mit Galaktose.

Aus den Versuchen 75—77 ist die Möglichkeit gegeben, das langsame Wachstum und die langsame Inversion des Rohrzuckers als Folge des ungewohnten Substrates zu betrachten. Vielleicht können im ähnlichen Sinne die folgenden Versuche mit Galaktose bis zu einem gewissen Grade gedeutet werden.

Denn unter natürlichen Bedingungen kommt die Versuchshefe Weihenstephan mit Galaktose nie in Berührung, auch die meisten sonstigen Hefen nicht. Wenn daher viele Hefen mit Galaktose nur mäßig wachsen, so mag hier der fixierte Einfluß der Umgebung zum Ausdruck kommen, womit natürlich andere Erklärungsgründe nicht ausgeschlossen sind.

Digitized by Google

Es wurden mit Galaktose folgende Versuche durchgeführt:

Vers. 84: 5% Galaktose (Merk) 0,3% Chlorammon,
0,25% KH_2PO_4, 0,15% $MgSO_4$,
„ 85: 0,3% Asparagin } wie Nährsalz
„ 86: 0,3% Weins. Ammon } in Vers. 84

Es wurden folgende Werte der aktuellen Säure erhalten:

	Vers. 84	Vers. 85	Vers. 86
Ausgangslösung: p_H	4,62	4,78	5,13
2 Tage	4,54	4,85	5,12
3 „	4,08	4,40	4,88
4 „	3,80	4,23	4,71
9 „	3,22	4,15	4,55
12 „	3,02	4,16	4,53
15 „	3,07	4,09	4,18

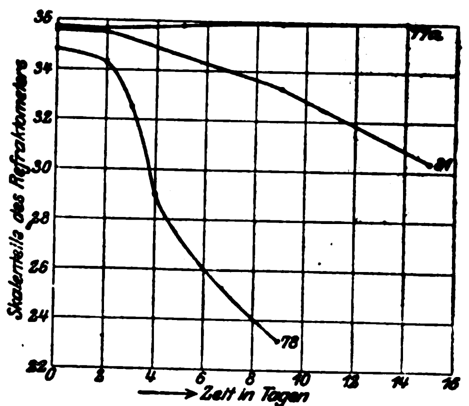
Die Werte der Refraktion folgen in der nächsten Übersicht:

Ausgangslösung	35,9	35,56	35,55
Refraktion nach 2 Tagen	35,9	35,6	35,3
„ „ 3 „	35,6	34,9	35,0
„ „ 4 „	35,1	34,9	34,2
„ „ 9 „	33,3	—	33,2
„ „ 12 „	31,3	34,3	31,4
„ „ 15 „	30,4	34,2	29,0

Aus diesen wenigen Angaben ist ersichtlich, daß Galaktose sehr langsam verarbeitet wird, immerhin ganz beträchtlich besser als Saccharose, wenn wir nur Versuch 77a (Saccharose-Asparagin) als Vergleichsversuch heranziehen. Mit Asparagin bleibt die Wachstumstätigkeit und die Säurebildung vom 5. Tage an annähernd konstant, während sowohl mit Chlorammon wie mit weinsteinsaurem Ammon Wachstum und Säurebildung langsam zunehmen, wie sowohl aus den Werten der aktuellen Säure wie aus der Refraktionstabelle zu ersehen ist. Das Gesamtverhalten der Galaktose ist vom Standpunkte der Gewöhnungstheorie zu verstehen. Inwieweit eine spezifische Zuckerwirkung hier vorliegen könnte, wurde nicht in den Bereich der Untersuchung gezogen. Jedenfalls ist sehr auffallend, daß mit Galaktose Asparagin (Versuch 85) ein durchaus deutliches Resultat, soweit Wachstum, Gärung und Säurebildung in Betracht kommt, erhalten wurde, während mit Saccharose Asparagin (Versuch 77a) nur geringe Säurebildung, keine Gärung und kein Zuckerverbrauch festgestellt werden konnte. Aus all diesen Angaben ist ersichtlich, daß in

Digitized by Google

keinem Falle mit einer Erklärung allein ein Fortschritt erzielt werden kann; neben spezifischer Zuckerwirkung darf die Möglichkeit der Gewöhnung nicht außer acht gelassen werden; auf den Einfluß der Reaktion und der Konzentration wurde eingangs schon hingewiesen. Man wird also wohl vier Gesichtspunkten nebeneinander abschätzen und verwerten müssen, um aus den vielen Widersprüchen der Literatur herauszukommen. Das Verhalten der 3 Zucker Maltose, Galaktose, Saccharose mit Asparagin als Stickstoffquelle ist in Abb. 8 dargestellt und sehr instruktiv.



Aus der Refraktionskurve ist der langsame Zuckerverbrauch bei Anwendung von Galatose gegenüber Maltose sehr deutlich, der Nichtverbrauch von Saccharose in der Versuchszeit steht außer Zweifel.
Verlauf der Refraktion.
77a Saccharose Asparagin. 78 Maltose Asparagin.
81 Galaktose Asparagin.
Abb. 8.

In den bisherigen Versuchen wurde festgestellt, daß unter den gewählten Bedingungen die Unterhefe Weihenstephan mit Chlorammon als Stickstoffquelle in einer Maltoselösung ein p_H von 2,55 erreichen kann. Damit ist aber noch lange nicht der durch Wachstum entstehende maximale erreichbare Säuregrad festgestellt. Hefe kann, wie der folgende Versuch beweist, beträchtlich höhere aktuelle Säuregrade erreichen und ohne Schaden gären. Für die Feststellung dieser maximalen Säuregrade wurden Heidelbeersäfte mit gleichen Teilen einer 30 proz. wäßrigen Rohrzuckerlösung versetzt, so daß der Gesamtrohrzuckergehalt 15% betrug. Da diese Säfte sehr stickstoffarm sind, wurden sie mit so viel Stickstoff versetzt, daß folgende Konzentrationen erhalten wurden:

Vers. 80: gezuckerter Heidelbeersaft ohne Zusatz von Stickstoff,
„ 81: „ „ + 40 g NH_4Cl im Hektoliter,
„ 82: „ „ + 120 g NH_4Cl „ „
„ 83: „ „ + Asparagin = 120 g NH_4Cl.

Wachstum und Gärung zeigte nach 4 Tagen folgenden Verlauf:

Vers. 80	Vers. 81—83
Schwach	Stark.

Digitized by Google

Der Verlauf der Bildung der aktuellen Säure war folgender:

	Vers. 80	Vers. 81	Vers. 82	Vers. 83
p_H (Ausgangslösung):	ca. 3,00	3,00	3,00	3,00
nach 2 Tagen	2,55	2,18	1,85	2,71
„ 5 „	2,47	2,50	2,16	2,63
„ 18 „	2,65	2,62	2,28	2,92

Es wird also hier ein p_H von 1,85 mit Chlorammon als Stickstoffquelle erreicht, eine für Hefe jedenfalls beträchtliche Wasserstoffionenkonzentration. Mit Asparagin ist der Säuregrad naturgemäß geringer, merkwürdigerweise sogar niedriger als ohne Stickstoffzugabe. Auffallend ist in allen 4 Fällen die rasche Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration nach erreichtem Säuremaximum.

Zusammenfassung der wichtigsten Resultate.

Die einzelnen Zucker scheinen in verschiedenem Maße auf die Plasmamembran einzuwirken, derart, daß im Sinne abnehmender Brauchbarkeit der Zucker für Hefe folgende Reihe entsteht:

Maltose — Dextrose — Lävulose — Saccharose.

Diese Wirkung ist bei vielen Hefen bei Maltose gleich Null, bei Saccharose sehr groß. Diese spezifische Zuckerwirkung kann durch Gewöhnung mehr oder weniger verändert worden, doch ist sie im Prinzip immer wieder zu erkennen[1]). Ebenso scheinen nach den Arbeiten anderer Autoren die Änderung der Reaktion und der Konzentration der Stickstoffquellen geringfügige Verschiebungen dieser Zuckerreihe zu bewirken.

Saccharose wird in der angewendeten sauren Lösung wohl invertiert, aber nicht oder nur sehr langsam vergoren (33 Tage Versuchszeit). Die Art der Stickstoffquelle, ob Aminosäure oder Ammonsalz, ist in der mineralischen saueren Lösung ohne nennenswerten Einfluß. Bei Verwendung von Maltose verschwinden alle ungünstigen Wirkungen; hier wirkt Chlorammon sogar etwas besser auf Wachstum und Gärung ein als Asparagin.

Der bei der Gärung nach vorausgegangenem Wachstum erreichte maximale Säuregrad betrug in einer Maltose-Chlor-

[1]) Diese Reihe gilt auch in der Umkehrung, so daß z. B. eine Hefe die Saccharose hervorragend vergärt sinngemäß Maltose nicht oder schlecht vergärt, wie z. B. eine jüngst von Will beschriebene Torula (Zeitschr. f. ges. Brauwesen 1920).

Digitized by Google

ammonlösung p_H 2,55. In einem mit Rohrzucker und Chlorammon versetzten Heidelbeersaft wurde bei lebhafter Gärung und normalem Wachstum ohne Schädigung der Hefe ein p_H von 1,85 erreicht[1]).

---

[1]) Nach Abschluß dieser Arbeit (November 1919) erschien eine Mitteilung von Euler und Heintze (Zeitschr. f. physiol. Chemie 108, 168 ff. 1919), in der angegeben wird, daß die verwendete Hefe noch bei p_H 1,50 wachsen und gären kann.

Digitized by Google

Quantitative Bestimmung des Ammoniak im Urin, in serösen Flüssigkeiten und in der Verbrennungsflüssigkeit der Kjeldhalbestimmung.

Von

Arnold Hahn und **Elisabeth Kootz.**

(Aus der inneren Abteilung des Krankenhauses der Jüdischen Gemeinde in Berlin.)

(Eingegangen am 4. März 1920.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Wiewohl das Ammoniak ein steter und wichtiger Bestandteil der Körperflüssigkeiten ist, haben die bisher bekannten Methoden seiner quantitativen Bestimmung noch keineswegs jenen Grad von Sicherheit und Einfachheit erreicht, der das Kennzeichen einer oft und seit langem verwendeten Analyse ist. Die primitive, lang dauernde und sehr ungenaue Methode nach Schlössing wurde von dem einfacheren aber keineswegs einfachen Verfahren nach Krüger-Reich-Schittenhelm abgelöst, schließlich gab Folin seine Analysenmethode der Luftdurchleitung an. Der eine von uns selbst hat vor einigen Jahren die Methode nach Krüger-Reich-Schittenhelm modifiziert und für kleine Ammoniakmengen eine gewisse Zeitersparnis erzielt[1]). Bei größeren Ammoniakmengen wurde jedoch auch diese Methode ungenau[2]).

Für alle angeführten Methoden ist Folgendes charakteristisch:

1. Das Ammoniak wird aus einer Flüssigkeit ausgetrieben. Aber man kann nie mit Sicherheit den Zeitpunkt angeben, wann alles Ammoniak übergegangen ist. Besonders bei dem Folinschen Verfahren muß oft stundenlang Luft durchgeleitet werden, ohne

[1]) Med. Klin. 1913, Nr. 39.

[2]) Ch. Schenitzky, diese Zeitschr. 76, 177.

Digitized by Google

daß ein Ende des Ammoniakübertrittes mit Sicherheit konstatiert werden kann.

2. Alle Methoden gehen von der Ansicht aus, daß der Harnstoff durch Natriumcarbonat leicht zersetzt werden kann und ergreifen daher Vorsichtsmaßregeln, welche die Analyse teils verzögern, teils ungenau machen.

3. Alle Methoden gehen von der Ansicht aus, daß das Ammoniak in erhitztem Zustande von Säuren nicht vollkommen oder nicht schnell genug aufgenommen wird und komplizieren infolge dieser Annahme wiederum den Analysengang.

Durch die weiter unten angeführten Versuche ergab sich die Grundlosigkeit der beiden Annahmen unter 2. und 3., und es wurde uns dadurch möglich, die Bestimmung des Ammoniaks so auszuarbeiten, daß sie im Urin und Serum in 5 Minuten erledigt werden kann.

Über den Einfluß der Temperatur auf die Flüchtigkeit des Ammoniaks.

Zu den folgenden Versuchen benützten wir das Verfahren nach Krüger-Reich-Schittenhelm mit den von Hahn angegebenen Modifikationen: In einen Destillationskolben wurde eine Lösung von 0,040 g Ammoniak in Form von Ammoniumsulfat in 25 ccm Wasser, 10 g Kochsalz, 1 g Natriumcarbonat und 30 ccm Alkohol (96%) gegeben. Auf dem Destillationsrohr des Kolbens befand sich ein von Hahn angegebener Eiskühler, die Vorlage wurde mit $^{n}/_{10}$-Säure beschickt und war ein einfacher, in Eis gestellter Kjeldhalkolben von 800 ccm Inhalt mit Zu- und Ableitungsrohr. Es wurde 5 Minuten bei vollfließender Wasserstrahlpumpe destilliert. Der Destillationskolben wurde in einem Wasserbade erwärmt, das jeweils die in der Tabelle I angeführten Temperaturen aufwies.

Tabelle I.

Verwendet NH_3	Temperatur	Gefunden
0,040	70°	0,0358
0,040	80°	0,0376
0,040	86°	0,0388
0,040	90°	0,0390
0,040	100°	0,0398

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, wie mit Erhöhung der Temperatur die Ausbeute an Ammoniak zunimmt und wie be-

Digitized by Google

sonders die letzten, hartnäckig zurückgehaltenen Reste bei höheren Temperaturen vollständig übergehen. Da bei einem bestimmten Drucke das Flüssigkeitsgemisch stets bei gleicher Temperatur siedet, scheint die erzielte Wirkung vor allem von der Intensität des Kochens abzuhängen. Dies veranlaßte uns, vom Wasserbade abzusehen und auf dem Drahtnetze direkt mit freier Flamme zu erhitzen.

Tabelle II.

Verwendet NH_3	Temperatur	Gefunden
0,040	kleine Flamme	0,0374
0,040	starke Flamme	0,0400

Es ergab sich also die Tatsache, daß es erst beim Erhitzen mit starker, freier Flamme möglich ist, das Ammoniak in 5 Minuten bei den gegebenen Versuchsbedingungen quantitativ wiederzugewinnen.

Über die Hitzebeständigkeit des Harnstoffs in alkalischer Lösung.

Die nächsten Versuche sollten Klarheit schaffen, ob der Harnstoff unter den angewandten Bedingungen der quantitativen Ammoniakausbeute nicht zersetzt wird. Zu diesem Zwecke wurde der Destillationsflüssigkeit 2 g Harnstoff zugesetzt und die Destillation bei freier Flamme vorgenommen. Die Höchsttemperatur der im Vakuum siedenden Flüssigkeit betrug 75°. Zwei Versuche ergaben folgendes übereinstimmendes Resultat:

Verwendet NH_3	Temperatur	Gefunden
$0{,}040 + 2\,g\,\overset{+}{U}$	starke Flamme	0,040

In einem zweiten Versuche wurde das Natriumcarbonat durch 33 proz. Natronlauge ersetzt, um auch die Wirkung eines starken Alkalis kennenzulernen.

Tabelle III.

Verwendet NH_3	Temperatur	NaOH	Gefunden
$0{,}040 + 1\,g\,\overset{+}{U}$	starke Flamme	1 ccm	0,0396
$0{,}040 + 1\,g\,\overset{+}{U}$	„ „	1 „	0,0398
$0{,}040 + 1\,g\,\overset{+}{U}$	„ „	5 „	0,0448

Der Harnstoff erwies sich also bei den gegebenen Bedingungen, d. h. bei 5 Minuten langem Erhitzen auf 70—75° im Vakuum

Digitized by Google

gegen 1 g Natriumcarbonat und 1 ccm 33 proz. Natronlauge als hitzebeständig; erst bei 5 ccm Natronlauge tritt eine kleine Zersetzung ein[1]).

Über die Absorbierbarkeit heißer Ammoniakdämpfe im Vakuum durch vorgelegte Säure.

Wie bereits oben erwähnt, wird die Flüchtigkeit des Ammoniaks über- bzw. die Absorptionsfähigkeit der vorgelegten Säure bisher unterschätzt. Darum wird stets auf Kühlung des Destillationsrohres und der Vorlage großer Wert gelegt, die Vorlage selbst vielfach in der Form der unhandlichen Poligotröhre verwendet, um den Weg der Ammoniakdämpfe durch die Säure zu verlängern. Ich erinnere auch an das Bangsche Mikroverfahren, bei dem ein besonderer Kühler aus Silberrohr mit Kupfermantel beschrieben wird. Folgende Tabelle zeigt, daß selbst bei der Vakuumdestillation und beim Erhitzen mit starker, freier Flamme jede Kühlung überflüssig ist.

Tabelle IV.

Verwendet NH_3	Temperatur	Kühlung	Gefunden
0,040	starke, freie Flamme	ohne Eiskühler	0,040
0,040	" " "	ohne Eiskühler und ohne gekühlte Vorlage	0,0399
0,040 + 2 g $\overset{+}{U}$	" " "	dasselbe	0,0400

Bei einem weiteren Versuche wurde absichtlich weniger Säure vorgelegt, als zur Absorption des entstehenden Ammoniaks nötig gewesen wäre. Es wurde verwendet 0,080 g NH_3, entsprechend 47,06 ccm $^n/_{10}$-Säure; vorgelegt wurden jedoch nur 30 ccm Säure, entsprechend 0,051 g NH_3. Absorbiert wurden 0,066 g NH_3. Es wurden also von der heißen, neutralen Flüssigkeit trotz des Vakuums noch um 0,015 g NH_3 mehr zurückgehalten, als der vorgelegten Säure entsprach. Damit ist hinreichend nachgewiesen, daß jede Kühlung überflüssig ist.

Schließlich wurde noch festgestellt, daß die Zugabe von Kochsalz für den Gang der Analyse ohne jede Bedeutung ist. Es ergab sich, daß das Ammoniak ohne Kochsalz unter den ge-

[1]) Vgl. Wurster, Zentralbl. f. Physiol. 1887, S. 486, der bereits angibt, daß Harnstoff im Vakuum bei 50° mit Barythydrat ohne Zersetzung eingedampft werden kann.

Digitized by Google

gebenen Bedingungen ebenso schnell und vollständig übergetrieben werden kann, wie mit Kochsalz.

Die Leistungsfähigkeit der 5-Minuten-Destillation ergibt sich aus folgenden Versuchen:

Tabelle V.

Verwendet NH_3	Gefunden
0,080	0,0796
0,100	0,0998
0,1200	0,1132

Aus diesen Zahlen ergibt sich, daß die 5-Minuten-Destillation bei der Analyse aller Körperflüssigkeiten verwendet werden kann.

Auf Grund obiger Versuche haben wir nun die quantitative Bestimmung des Ammoniaks für physiologische Zwecke ausgearbeitet.

A. Eiweißfreier Urin.

In einen Destillationskolben von etwa 500 ccm Inhalt gibt man 25 ccm Urin, 30 ccm Alkohol (96%) und einige Körnchen Bimsstein. Mittels eines kurzen Schlauchstückchens verbindet man das Destillationsrohr des Kolbens mit einem Einleitungsrohre, das durch die eine Öffnung eines doppelt durchbohrten Gummistopfens auf den Grund eines Kjeldahlkolbens von 800 ccm Inhalt reicht. Durch die zweite Bohrung des Stopfens führt man ein gebogenes Rohrstück, dessen eines Ende gleich unterhalb des Stopfens endet, dessen anderes Ende durch einen Schlauch mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden ist. Der Kjeldhalkolben wird mit 10 ccm $^{n}/_{10}$ Salz- oder Schwefelsäure und 30 ccm Wasser beschickt. Nach Zusammenstellung des Apparates, die in kürzester Zeit geschehen ist, fügt man zum Urin 1 g Natriumcarbonat in Substanz, am besten durch einen weiten Trichter mit langem Rohre, damit nichts an den Wandungen des Destillationskolbens haftenbleibt, verschließt sodann den Kolben mit einem Gummistopfen und läßt die Wasserstrahlpumpe laufen. Unter das Drahtnetz, auf dem der Destillationskolben steht, stellt man einen starken Brenner mit kräftiger Flamme. Nach 5 Minuten, gerechnet von dem Zeitpunkte, da man den Brenner unter den Kolben gestellt hat, unterbricht man durch Lösen der Verbindung des kurzen Schlauchstückes zwischen Kolben und Vorlage die Destillation, spült das Einleitungsrohr mit Wasser innen und außen sorgfältig ab, kühlt die Vorlage unter fließendem Wasser, setzt 6 Tropfen einer 1 proz. Lösung

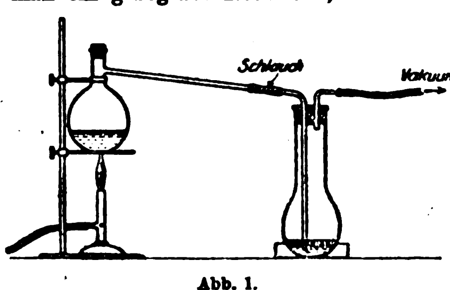


Abb. 1.

Digitized by Google

von alizarinsulfosaurem Natrium hinzu und titriert mit $^n/_{10}$-Lauge. Die Differenz zwischen Säure und Lauge mit 1,7 mg multipliziert ergibt die Menge NH_3 in 25 ccm Urin.

Um die in den Versuchen mit reinem Ammoniumsulfat in wässeriger Lösung ermittelten Befunde auf ihre Stichhaltigkeit bei Verwendung von Urin zu prüfen, wurden folgende Versuche angestellt: Ein Urin verbrauchte bei einer Doppelbestimmung nach oben beschriebener Methode:

1. 2,45 ccm $^n/_{10}$-Säure,
2. 2,50 ccm $^n/_{10}$-Säure.

Zu dem Destillationsrückstand des Urins der zweiten Bestimmung wurden 10 ccm Wasser zugefügt und die 5-Minuten-Destillation nach Zugabe von Alkohol noch einmal wiederholt. Verbrauch an vorgelegter Säure: 0,02 ccm. Der nunmehr erhaltene Destillationsrückstand wurde wiederum mit 10 ccm Wasser aufgefüllt und ihm 10 ccm $^n/_{10}$-Ammoniumsulfat zugesetzt und neuerlich nach Zusatz von Alkohol die Destillation ausgeführt. Verbrauch an Säure: 10,00 ccm. Hieraus folgt, daß 1. schon nach der Destillation von 5 Minuten alles Ammoniak innerhalb der Fehlergrenzen ausgetrieben war; 2. daß sich selbst bei dreimaliger Destillation desselben Urins kein Harnstoff zersetzt. Die 25 ccm Urin enthielten, wie eine Analyse ergab, 0,315 g Harnstoff, entsprechend 0,178 g NH_3 entsprechend etwa 105 ccm $^n/_{10}$-Säure.

Dieselben Resultate erhielten wir bei Zugabe von 1 ccm 33 proz. Natronlauge. Eine neuerliche Destillation des Destillationsrückstandes ergab 0,00 ccm Verbrauch an Säure. Die gefundenen Werte stimmten mit denen der Bestimmung mit Natriumcarbonat genau überein.

B. Eiweißhaltiger Urin.

Eiweißhaltige Urine müssen aus zwei Gründen vor der Destillation enteiweißt werden; erstens macht das starke Schäumen die Destillation unmöglich, zweitens wird Ammoniak von eiweißhaltigen Lösungen sehr stark retiniert. Wir verfahren folgendermaßen:

25 ccm Urin werden in einen 50 ccm Meßkolben eingebracht, dazu gibt man etwa 10 ccm Wasser und hierauf 10, bei stark eiweißhaltigen Urinen 15 ccm Phosphorsäure-Wolframatmischung, füllt bis zur Marke auf und filtriert. 25 ccm des Filtrates werden dann, wie sub. A behandelt, nur gibt man diesmal 2 g Natriumcarbonat hinzu. Die gefundenen NH_3-Zahlen beziehen sich dann auf 12,5 ccm Urin.

Die Phosphorsäure-Wolframatmischung stellen wir her, indem wir 45 g Natrium-Wolframat (am besten von Merck) in 900 ccm Wasser auflösen, dazu 37 ccm der gebräuchlichen konz. Phosphorsäure (etwa 84%) hinzusetzen und dann auf 1000 auffüllen. Ein Überschuß dieser Mischung löst im Gegensatz zu Literaturangaben über Phosphor-Wolframsäure Eiweiß nicht auf; Ammoniak und Harnsäure werden in der gebrauchten Verdünnung davon nicht gefällt.

Eiweißfreie, jedoch schäumende Urine sind wie eiweißhaltige zu behandeln.

Digitized by Google

C. Blutserum.

Die Bestimmung des Ammoniaks im Serum ist wegen der geringen, im Blute vorkommenden Ammoniakmengen selbst bei Verwendung von 10 ccm Serum eine Mikrobestimmung. Die Hauptschwierigkeit bildet die Titration der alkoholischen $^n/_{100}$-Säure. Durch Verwendung des weiter unten angegebenen Indicators wurde sie überwunden.

Ausführung: 10 ccm Serum werden in einen Meßkolben von 50 ccm eingebracht, hierauf gibt man etwa 15 ccm Wasser hinzu, dann unter Umschütteln 15 ccm der bei eiweißhaltigem Urin angegebenen Phosphorsäure-Wolframatmischung und füllt mit Wasser zur Marke auf. Von dem Filtrate verwendet man zur Ammoniakbestimmung 25 ccm, entsprechend 5 ccm Serum. Der Gang der Operation entspricht dann dem bei Urin angegebenen, nur legt man in diesem Falle $^n/_{100}$-Säure vor.

Die Schwierigkeiten der Alkalimetrie bei Verwendung von $^n/_{100}$-Titrierflüssigkeiten sind bekannt. Das Zurückpendeln der Farben in der Nähe des Neutralisationspunktes scheint eine exakte Bestimmung unmöglich zu machen. Gewöhnlich wird diese Erscheinung auf die elektrolytische Dissoziation zurückgeführt. Bei unseren Versuchen hat sich jedoch ergeben, daß man mit einem Indicator der weiter unten angegebenen Zusammensetzung einen scharfen Umschlag erzielen kann und daß bei Farbenschwankungen, die etwa dabei auftreten sollten, immer kleine, in der Flüssigkeit vorhandene CO_2-Mengen die Ursache sind. Mit CO_2-freien Flüssigkeiten und in Räumen, in denen mit CO_2 nicht gearbeitet wurde, gelang es uns immer mühelos, einen scharfen Farbenumschlag zu erzielen.

Bereitung des Indicators: 1 g alizarinsulfosaures Natrium wird in 100 ccm Wasser aufgekocht und in heißem Zustande in eine braune, gutschließende Vorratsflasche filtriert.

0,05 g Methylenblau werden in 100 ccm Wasser aufgekocht und in heißem Zustande in eine zweite braune, gutschließende Vorratsflasche filtriert.

Diese beiden Lösungen im Verhältnis von 1 alizarinsulfosaures Natrium zu 2 Methylenblau zur Titrationsflüssigkeit zugesetzt, geben einen klaren Umschlag von Grünbraun in Violett.

In unserem Falle setzen wir der gekühlten Säure 0,25 ccm alizarinsulfosaures Natrium und 0,5 ccm Methylenblau zu und titrieren mit $^n/_{100}$-NaOH. Es ist darauf zu sehen, daß die $^n/_{100}$-Lauge CO_2-frei ist. Die Flasche darf nicht überflüssig lange offen stehen, besonders wenn sie nicht mehr vollgefüllt ist.

Wie bereits oben erwähnt, ist dieses Verfahren selbst bei Verwendung von 10 ccm Serum ein Mikroverfahren, die Resultate schwanken um 1 ccm verbrauchter $^n/_{100}$-Säure. Die Zuverlässigkeit der Methode wurde in der Weise geprüft, daß man 10 ccm eines bestimmten Serums erst für sich auf Ammoniak untersuchte und dann zu anderen 10 ccm desselben Serums 2 ccm $^n/_{100}$-Ammoniumsulfat zusetzte und hierauf ebenfalls den Ammoniakgehalt bestimmte.

Digitized by Google

Es wurden verbraucht bei:

1. 0,72 ccm $^n/_{100}$-Säure,
2. 2,73 ccm $^n/_{100}$-Säure.

Es ergab 1 — 2 = 2,01 ccm $^n/_{100}$-Säure gegen berechnet: 2,00 ccm.

Nun war noch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß das Verfahren wohl imstande sei, Mikromengen Ammoniak aus dem enteiweißten Blute auszutreiben, daß jedoch immerhin dieser Fähigkeit eine Grenze bei einem gewissen Verhältnis zwischen Flüssigkeitsmenge und schließlich zurückbleibendem Ammoniak gesetzt sei. Das heißt, daß bei jeder Destillation bei Verwendung von 25 ccm Flüssigkeit eine konstante, nicht austreibbare Mikromenge Ammoniak zurückbleibt. Folgender Versuch mußte Klarheit schaffen. Es wurde einmal in 5 ccm eines Serums das Ammoniak bestimmt, das andere Mal in 10 ccm desselben Serums. Wäre die oben in Erwägung gezogene Erscheinung vorhanden, so müßte bei Bestimmung 1 und 2 dieselbe Mikromenge Ammoniak zurückbleiben, da mit denselben Flüssigkeitsmengen gearbeitet wurde. Die gefundenen Ammoniakmengen dürften sich also verhalten wie $(M - a) : (2\,M - a)$. Die Bestimmung 2 müßte also nicht das Doppelte der Bestimmung 1 sein. Es wurde jedoch gefunden, daß 2 genau das Doppelte von 1 war. Es geht also bei der Destillation alles Ammoniak über.

Da es keine Standartmethode für Ammoniak gibt, haben wir darauf verzichtet, unsere Methode mit früheren zu vergleichen, wir haben vielmehr durch direkte Experimente den Beweis der Zuverlässigkeit zu erbringen versucht.

Ammoniakbestimmung beim Kjeldhalverfahren.

In diesem Falle braucht keine Rücksicht auf den Harnstoff genommen zu werden. Man kann also ohne Vakuum und unter Verwendung größerer Alkalimengen destillieren. Nach den gebräuchlichen Vorschriften wird zur Kjeldhalbestimmung zu viel Substanz verwendet. Für Urin und Serum genügt immer die Verwendung von 1 ccm, und auch bei der Reststickstoffbestimmung kommt man mit 1 ccm Serum zu vollkommen genauen Resultaten. Im ersteren Falle (Makroverfahren) verwenden wir zur Verbrennung 1 ccm, höchstens 2 ccm Schwefelsäure in letzterem (Mikroverfahren) immer 1 ccm Schwefelsäure. Die Verbrennung führen wir in Kjeldhalkolben von 200 ccm Inhalt aus. Nach beendigter Verbrennung setzen wir der Flüssigkeit 10 ccm Wasser (bei Verwendung von 2 ccm Schwefelsäure — 5 ccm Wasser) zu, kühlen unter fließendem Wasser ab, lassen dann 25 ccm Alkohol so zufließen, daß die Wandungen des Kolbens abgespült werden und verbinden nach Einbringen eines Siedesteinchens den Kolben mit der einfachen Apparatur, die aus der Abbildung ersichtlich ist. Dann setzen wir vorsichtig, ohne die Flüssigkeit aufzurühren,

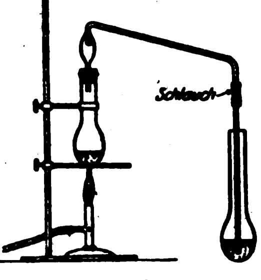


Abb. 2.

Digitized by Google

5 ccm 33 proz. Natronlauge (wurden 2 ccm Verbrennungssäure verwendet ccm Lauge)10 hinzu. Als Vorlage verwenden wir einen offenen Kjeldhalkolben von 200 ccm Inhalt, der mit 10 ccm $^n/_{10}$-Säure beim Makro-, mit 10 ccm $^n/_{100}$-Säure beim Mikroverfahren beschickt ist. Die Destillation wird ohne Vakuum ausgeführt. Die Flüssigkeit siedet, wenn die Natronlauge ohne Umschütteln zugesetzt wurde, ganz ruhig, erst nach 4—5 Minuten tritt Stoßen ein. Beim Auftreten des ersten starken Stoßens unterbricht man die Destillation, sie ist dann beendet. Ein Kochen des übergegangenen Alkohols in der Vorlage ist ohne schädigenden Einfluß auf das Analysenresultat. Die Titration wird nach Abkühlung mit $^n/_{10}$-(Makro-) oder $^n/_{100}$-(Mikro-) Natronlauge unter Verwendung der oben angegebenen Indicatoren ausgeführt.

Digitized by Google

Untersuchungen über die Oberflächenspannung des Urins und ihre Anwendung auf die klinische Pathologie.

Von

W. Schemensky.

(Aus dem Institut für Kolloidforschung zu Frankfurt a. M. und der Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt a. M.).

(Eingegangen am 9. März 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Lichtwitz[1]) kam auf Grund kolloidchemischer Urinuntersuchungen und -befunde zu der Ansicht, daß die kolloidalen Stoffe des Harns als das Material aufzufassen sind, an dem sich in den Zellen die Konzentrations- und Sekretionsprozesse abgespielt haben. Er fand bei seinen Versuchen die Kolloidmenge des Harns parallelgehend mit seiner molaren Konzentration und äußert die Anschauung, daß die einzelnen Nierenzellen verschiedene Kolloide enthielten, die jedes einzelne Affinität nur zu einem bestimmten Sekretionsstoff hätte. Die aus kolloidalem Zellinhalt, dem Zellprotoplasma (SOL), durch Übergang in festere Phase (GEL) gebildeten Granula werden nach Ansicht von Lichtwitz, wie mikroskopische Betrachtung ergibt, in toto, mit Sekretionsstoffen beladen, in das Kanalsystem abgegeben. Wie diese Wanderung zustande kommt, vermag er nicht zu sagen, er denkt dabei an Oberflächenkräfte. Mit Recht betont Volhard[2]), daß nach dieser Vorstellung sogar eine partielle Erschöpfung der Nierenzellen denkbar wäre, dergestalt, daß eine Verarmung an einem nur für eine Teilfunktion eingerichteten Kolloid bzw. seine Zustandsänderung zu einer partiellen Störung der Ausscheidungs- oder Konzentrationsfähigkeit für bestimmte Stoffe, z. B. Harnstoff, Kochsalz usw. führen könnte. Und noch ein weiteres ergibt sich aus den Lichtwitzschen Vorstellungen. Mit den Sekretionsstoffen gehen, wie er annimmt, Zellbestandteile kolloider Natur in den Harn über, die kolloidalen, auch im normalen Harn vorhandenen Stoffe können mit diesem Sekretionsprozeß zusammenhängen, und es ist vorstellbar, daß sich mit örtlichen Veränderungen der secernierenden Nierenzellen oder auch mit oberhalb der Niere liegenden Änderungen im Stoffwechsel Kolloidmenge und -art im Harn ändern.

Mit Rücksichtnahme auf diese Vorstellungen legten wir uns die Frage vor, ob es möglich wäre, durch eine Methode, die

Digitized by Google

als feines Reagens auf kolloide Stoffe gelten konnte, im menschlichen Urin Veränderungen festzustellen, die uns vielleicht diagnostisch wertvolle Störungen aufdecken ließen. Wir wählten dazu die Bestimmung der Oberflächenspannung, die ja im weitesten Umfang durch Kolloide beeinflußbar ist.

Bei der Wahl unter den zahlreichen Methoden zur Bestimmung der Oberflächenspannung mußten wir eine solche heranziehen, die bei genügender Genauigkeit leicht und rasch ausführbar war; ferner mußte man sich von ihr versprechen, daß mit Rücksicht auf eventuelle Verwendung in der Klinik auch weniger geübte Untersucher sich leicht in sie einarbeiten können. Unter diesen Methoden schien uns am geeignetsten die mit dem von J. Traube angegebenen Stalagmometer, auf das wir nachher noch zurückkommen werden. Bei der Benutzung desselben waren wir uns bewußt, daß es sich dabei nicht um eine exakte Methode handelt, unser Ziel war jedoch nur, klinisch verwertbare Resultate zu bekommen, nicht quantitativ genaue Messungen vorzunehmen.

Traubes[3]) mit dem gleichen Apparat vorgenommenen Untersuchungen liegen in anderer Richtung als die unseren, er studierte mit Hilfe seiner Methode die Resorptionsvorgänge im Körper. Was uns an seinen Arbeiten interessiert, ist die Untersuchung normaler und pathologischer Urine. Untersuchungen in ähnlicher Art und Anordnung wie J. Traube hat auch Bickel[4]) angestellt, der zu ähnlichen Resultaten wie Traube kommt. Auch Boglia[5]) beschäftigt sich mit Oberflächenspannungsuntersuchungen in ihrer Beziehung zur Resorption, jedoch nahm er ebenso wie Török[6]) zu diesen Untersuchungen künstlich hergestellte Flüssigkeiten.

Auf Einzelheiten dieser Arbeiten wollen wir nicht eingehen, sie bewegen sich alle in anderer Richtung als unsere Untersuchungen; wir haben sie andererseits jedoch erwähnt, weil die physiologisches und pathologisches Geschehen im Körper mit der gleichen Methode untersucht haben, wie wir sie bei anderer Fragestellung anwandten.

Bei unsern Versuchen hielten wir es zunächst einmal für notwendig, eine Methode auszuarbeiten, die einen Vergleich der einzelnen Oberflächenspannungsbestimmungen, d. h. Tropfenzahlen untereinander ermöglicht. Der Harn ist diejenige Körperflüssigkeit, die in ihrer Zusammensetzung den größten Schwankungen unterworfen ist. Der Säuregrad jedes Harns ist ein verschiedener; ferner ist die Menge der gelösten Substanzen, die molare Konzentration, sehr wechselnd, und da, wie Lichtwitz fand, molare Konzentration und Kolloidmenge im Harn parallel

Digitized by Google

gehen, die Kolloide aber als oberflächenaktive Stoffe die Oberflächenspannung beeinflussen, so ist es klar, daß alle diese Fehlerquellen bei unbehandelten gewöhnlichen Urinen nicht beseitigt und daher die an ihnen mit dem Stalagmometer gefundenen Resultate untereinander nicht vergleichbar sind. Um diese Fehler zu vermeiden, ist deshalb bei Versuchen an Urinen das spezifische Gewicht zu berücksichtigen, es wird am besten stets auf gleiche Höhe gebracht, und ferner sind die Urine bei stets der gleichen Ionenkonzentration untersucht worden. Auf diese Fehlerquellen ist bei den stalagmometrischen Urinuntersuchungen, soweit wir uns in der Literatur davon überzeugen konnten, nicht geachtet worden und sind deshalb die betreffenden Resultate nicht ohne weiteres verwertbar.

Methodik.

1. Stalagmometer.

Wir bedienten uns wie schon erwähnt des J. Traubeschen Stalagmometers, anfangs in seiner ursprünglich etwas primitiven Form, später in einer von mir verbesserten Anordnung. Für die, die mit der Methode nicht vertraut sind, sei erwähnt, daß es sich um ein Instrument handelt, bei welchem man ein bestimmtes Flüssigkeitsvolumen abtropfen läßt. Je größer die Oberflächenspannung, desto grösser der einzelne Tropfen, desto geringer die Zahl der Tropfen, in die sich das gleiche Flüssigkeitsvolum zerteilt. Man kann also aus der Zahl der Tropfen die Oberflächenspannung berechnen oder bei Verwendung stets des gleichen Instrumentes direkt die Tropfenzahl untereinander in Beziehung bringen.

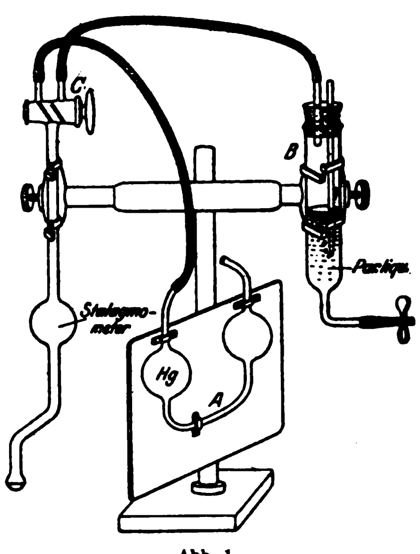


Abb. 1.

Bei längeren Versuchsreihen empfindet man das Ansaugen und Ausblasen des Instrumentes mit dem Munde als sehr lästig und anstrengend, auch die Regulierung der Tropfenzahl, die 20 Tropfen pro Minute nicht übersteigen soll, war selbst mit Klemmschraube, die an kleinen Gummiansatz am oberen Ende angebracht war, nicht möglich. Mir kam es darauf an, selbsttätiges Füllen und Entleeren des Apparates zu ermöglichen, ferner eine Regulationsvorrichtung für die Tropfengeschwindigkeit zu

Digitized by Google

schaffen (s. Abb.). Ersteres erreichte ich damit, daß ich seitlich, durch Gummischlauch mit dem Stalagmometer verbunden, ein U-förmiges Rohr mit kugeligen Erweiterungen in jedem Schenkel anbrachte (*A*), so daß das Volum der kugeligen Erweiterung, jederseits etwas größer ist als das Volumen des Stalagmometers. Das U-förmige Rohr wird beiderseits bis zur Hälfte mit Quecksilber gefüllt und durch Zurseitekippen wird ein Ansaugen bei Füllen des Apparates infolge geschaffenen luftverdünnten Raumes erreicht bzw. ein Druck durch die Quecksilbersäule zur Entleerung des Apparates. Die Regulierung der Tropfgeschwindigkeit erfolgt dadurch, daß in dem Behälter *B*, der zur Hälfte mit Paraffin, liquid. gefüllt und durch Schlauch mit dem Stalagmometer verbunden ist, eine Pipette mit fast capillarer Spitze taucht. Durch mehr oder weniger tiefes Einsenken der Pipette in die Flüssigkeit wird der Widerstand, der der drückenden Luftsäule entgegengesetzt wird, vermehrt oder vermindert, und dies hat Vermehrung oder Verminderung der Tropfenzahl zur Folge.

Am Stalagmometer selbst ist ferner noch eine Zweiwegehahn (*C*) angebracht, der jeweils den Gebrauch nur eines Systems, des U-Rohrs (*A*) bzw. der Luftsäule mit dazwischen geschaltetem Widerstand (*B*) ermöglicht.

Die Fehlergrenze beträgt nach unseren zahlreichen Versuchen, die auch durch mehrfache Kontrolle verifiziert wurde, $\pm$ 2,5. Nachdem wir jetzt dreiviertel Jahre bereits mit dem Stalagmometer arbeiten, sind wir in der Tropfenzahl nicht zu der Genauigkeit gekommen, wie sie Ascoli und Izar[7]) in ihren Arbeiten fanden, die bei steten Doppelbestimmungen die Fehlergrenze mit $\pm$ 0,5 Tropfen angeben, wie aus ihren Versuchen erhellt.

Wir benutzten stets das gleiche Stalagmometer von 69,2 Tropfen auf Wasser bei 15° berechnet; nur bei den Vorversuchen wurde ein Stalagmometer benutzt, das 50,3 Tropfen auf Wasser bei 15° berechnet gab. Auch die Tropfenzahlen, die in unseren Versuchen sich fanden, beziehen sich stets auf die Temperatur von 15°.

2. Standardurine.

a) Spezifisches Gewicht.

Es liegt in der Methode, daß Urine je nach dem spezifischen Gewicht verschiedene Tropfenzahlen ergeben. Die folgende Tabelle, in der aus unseren Untersuchungen wahllos einige Fälle herausgegriffen sind, beleuchtet dies.

Tabelle I.

Versuchs-nummer	Name	Diagnose	Spez. Gew.	Tropfenzahl
16	B.	gesund	1026 1010	80,8 72,5
17	O.	gesund	1024 1010	78,9 72,5
38	V.	Typhus	1018 1010	84,5 76,5

Digitized by Google

Um für klinische Zwecke eine leicht verwendbare Methode zu bekommen, brachten wir die stets filtrierten Urine*) zunächst auf gleiches spezifisches Gewicht durch Verdünnen mit destilliertem Wasser; wir wählten zu dem Zweck eine mittlere Zahl, 1010.

b) H-Iönenkonzentration.

Von der Überlegung ausgehend, daß die H-Ionenkonzentration jedes Urins eine andere ist, suchten wir uns über den Einfluß derselben auf die Oberflächenspannung des Urins zu überzeugen. Beim Zusatz mußten wir darauf achten, daß das Flüssigkeitsvolum nicht erheblich und ungleichmäßig vermehrt wurde; wir setzten daher zunächst 0,04 ccm 10 proz. HCl zu und ließen dann Normalsalzsäure nachfließen bis zum Umschlag von Methylorange von Gelb in Orange und Kongorot von Rot in Hellblau. Anfängliche grobe zur Orientierung angesetzte Versuche zeigten uns jedesmal die oberflächenspannungsvermindernde Wirkung der H-Ionen wie sie aus folgendem Versuch erhellt:

Tabelle II.

Versuchsnummer	Tropfenzahl		HCl-Zusatz in ccm
	Urin	Urin + H-Ionenzusatz	
20	56,5	65,5	0,22

Nachdem wir die Beeinflussung der Oberflächenspannung, d. h. der Tropfenzahl, in dem eben angedeuteten Sinne gefunden hatten, mußten wir auch hier stets die gleichen Verhältnisse in den Urinen schaffen, d. h. wir brachten stets gleiche Urinportionen auf die gleiche H-Ionenkonzentration und verwandten als Indicator dafür die Umschlagszone von Methylorange von Gelb in Orange und Kongorot von Rot in Hellblau. Es ist dies eine H-Ionenkonzentration von $10^{-4,1}$ bis $10^{-3,8}$.

Bei Zusatz von Säure nimmt die Tropfenzahl anfangs stark zu, steigt dann nur noch unmerklich, um zum Schluß zuweilen abzufallen. Die folgende Tabelle veranschaulicht dies.

*) Dabei zeigte es sich durch vergleichende stalagmometrische Messungen, daß eine Beeinflussung der Oberflächenspannung durch Filtrieren nicht eintritt, die Tropfenzahl blieb in zahlreichen untersuchten Fällen vor und nach Filtrieren stets die gleiche.

Digitized by Google

Tabelle III.

Normalurin, spez. Gewicht 1010.

Name	Diagnose	Urin-befund	Tropfenzahl		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin		Verbrauchte Säure bei Schüttelurin gegenüber gew. Urin in %	Stalagmometrischer Quotient
			Urin	Schüttelurin	Urin	Schüttelurin		
1. W.	Ren mobilis	normal	76,6	72,0		.		1,063
		Reaktion: sauer	84,8	72,3	0,11	0,07	63,6	1,172
			86,1	71,5	0,13	0,1	76,9	1,204
			86,6	71,9	0,17	0,11	64,7	1,204
			86,7	72,2	0,26	0,23	88,4	1,201
2. S.	gesund	normal	78,1	72,8				1,072
		Reaktion: sauer	82,7	71,2	0,06	0,04	66,6	1,161
			83,2	71,2	0,07	0,06	85,7	1,168
			83,3	71,2	0,09	0,06	66,6	1,169
			84,0	71,3	0,29	0,22	75,8	1,178
3. K.	Polymyositis abgelaufen	normal	72,5	69,7				1,041
		Reaktion: sauer	79,1	70,9	0,06	0,04	66,6	1,115
			79,1	70,4	0,07	0,05	71,4	1,123
			80,0	71,0	0,1	0,07	70,0	1,126
			80,3	71,0	0,22	0,18	81,8	1,130
4. Sch.	Grippe abgelaufen	normal	73,9	71,7				1,031
		Reaktion: sauer	81,5	71,2	0,05	0,04	80,0	1,144
			81,1	70,9	0,07	0,05	71,4	1,143
			81,1	70,9	0,09	0,05	55,5	1,143
			84,5	72,0	0,23	0,2	86,9	1,173
5. Schm.	alte Tbc.	normal	74,0	71,3				1,039
		Reaktion: sauer	80,4	71,6	0,06	0,04	66,6	1,122
			81.1	71,5	0,07	0,05	71,4	1,132
			81,5	71,4	0,07	0,06	85,7	1,141
			80,5	71,5	0,22	0,18	81,8	1,125

Es war zweckmäßig, eine Konzentration zu wählen, bei der kleine Fehler die Tropfenzahl möglichst wenig beeinflussen, wodurch also die Fehlergrenze möglichst herabgesetzt wird. Dies war der Fall in dem H-Ionenkonzentrationsgebiet von $10^{-4,1}$ bis $10^{-3,8}$, bei dem wir den obengenannten Umschlag für Methylorange und Kongorot finden.

Von dem einen von uns gewählten Indicator, dem Kongorot, ist bekannt, daß er nicht als scharfer Indicator bei Gegenwart von Eiweiß und Peptonen gilt, d. h., daß eine verschiedene H-Ionenvermehrung notwendig ist, um den gleichen Farbenumschlag zu

Digitized by Google

bekommen, je nachdem es sich um Normal- oder eiweißhaltige Urine handelt. Um uns über die Fehlergrenzen zu orientieren innerhalb deren die Menge der zuzusetzenden H-Ionen schwankt, setzten wir folgende Versuche an:

1. Normalurin mit Säurezusatz bis zum Umschlag von Kongorot in Hellblau.
2. Normalurin + Serum mit Säurezusatz bis zum Umschlag von Kongorot in Hellblau.
3. Normalurin + Pepton mit Säurezusatz bis zum Umschlag von Kongorot in Hellblau.

Dabei entsprachen Serum- bzw. Peptonzusatz annähernd gleichen Gewichtsprozenten Trockenrückstand.

Die folgende Tabelle zeigt den Ausfall des Versuchs:

Tabelle IV.

Untersuchtes Gemisch und Menge	Säurezusatz bis zum Umschlag von Kongorot in Hellblau
1. Normal-Urin 10 ccm	0,26
2. 9,6 ccm Urin + 0,4 Serum . . .	0,26
3. 9,96 ccm Urin + 0,04 Pepton .	0,28

Man sieht, daß bei 3. der Tabelle ein etwas höherer Säurezusatz als bei 1. und 2., die gleich sind, notwendig ist. Der Unterschied beträgt 0,02 ccm, d. h. 7,5% und ist praktisch ohne Bedeutung. Es gilt dies für mittleren Eiweißgehalt, wie er in den meisten pathologischen Fällen vorkommt.

c) Adsorption.

Die die Oberflächenspannung beeinflußenden Substanzen sammeln sich an der Grenzfläche an und werden durch Adsorbentien entfernt. Um nun die Oberflächenspannung auch der dieser Substanzen beraubten Urine zu messen, benutzten wir als bestes Adsorbens Tierkohle und zwar in 10 proz. Aufschwemmung. Wir schüttelten die Urine stets 10 Minuten und erhielten dann fast immer völlig wasserklare Flüssigkeiten mit wenigen Ausnahmen, über die noch bei den betreffenden Gruppen berichtet wird. Bei diesen Ausnahmen zeigte sich das nach dem Schütteln erhaltene Filtrat noch leicht gelblich gefärbt, auch die Tropfenzahl dieser Filtrate verhielt sich gegenüber der bei den wasserklaren namentlich nach H-Ionenvermehrung verschieden. Während die

Digitized by Google

Tropfenzahl der wasserklaren Filtrate sich stets der Wasserzahl bis auf 1—2 Tropfen näherte und auf H-Ionenkonzentrationserhöhung keine Vermehrung zeigte, war die Tropfenzahl bei dem leicht gefärbten Filtrat etwas größer, und auf H-Ionenvermehrung zeigte sich weitere Vermehrung der Tropfenzahl. War demnach in dem nach dem Schütteln noch gefärbten Filtrat die Adsorption auch keine völlige gewesen, die man evtl. mit Erhöhung der Tierkohlenmenge erreicht hätte, so gingen wir bei unseren Versuchen trotzdem nicht über eine 10 proz. Aufschwemmung hinaus, um auf diese Weise stets die gleichen Versuchsbedingungen zu erhalten.

d) Stalagmometrischer Quotient.

Die Tropfenzahl wechselt je nach dem Instrument, das verwandt wird, das eine gibt eine andere Zahl als das andere.

Um zu vergleichbaren Zahlen zu gelangen, könnte man die Tropfenzahl des Urins beziehen auf die Tropfenzahl einer Standardlösung z. B. reines Wasser am gleichen Stalagmometer gemessen. Fände man z. B. bei einem Urin 80 Tropfen, während Wasser im gleichen Stalagmometer 60 Tropfen gibt, so gäbe der Quotient $\frac{80}{60} = 1{,}333$. Bei einem andern Stalagmometer ergäbe der gleiche Urin z. B. 120 Tropfen, Wasser 90 Tropfen; der Quotient wäre ebenfalls 1,333. Man erhielte also bei verschiedenen Instrumenten vergleichbare Zahlen. Wir wollen heute nicht ohne weiteres behaupten, daß in Zukunft ein solcher Quotient nicht vielleicht praktischen Bedürfnissen genügt. — Vorläufig hielten wir es jedenfalls für richtiger, die Tropfenzahl des Urins zu beziehen auf den gleichen Urin, nachdem die adsorbierbaren (oberflächenaktiven) Substanzen daraus entfernt waren. Die mit einem Adsorbens behandelten Urine geben nämlich, trotz gleichen spezifischen Gewichts keineswegs gleiche Tropfenzahlen. Wie aus Tabelle III hervorgeht, schwankten die Zahlen zwischen 69,7 und 72,8. Welche Bedeutung diesen Schwankungen zukommt, vermögen wir heute noch nicht zu übersehen. Wir haben deshalb stets ausgerechnet das Verhältnis des Standardurins, d. h. einmal des Urins vom spezifischen Gewicht 1010 (St 1) mit dem gleichen Urin, aus dem die oberflächenaktiven Stoffe durch Adsorption entfernt sind (St 0) $= \frac{\text{St } 0}{\text{St } 1}$; das andere Mal das Verhältnis

Digitized by Google

des gleichen Urins nach Säurezusatz (H-Ionenkonzentration bis zum Umschlag von Methylorange von Gelb in Orange und Kongorot von Rot in Hellblau) (S 1) mit dem gleichen, aus dem die oberflächenaktiven Stoffe entfernt waren (S 0) $= \frac{S\,1}{S\,0}$. Das Verhältnis I. $\frac{St\,1}{St\,0}$ bzw. II. $\frac{S\,1}{S\,0}$ bezeichneten wir als „stalagmometrischen Quotienten" und nannten von diesen beiden „I." den „Quotienten" schlechthin, „II." den „Säurequotienten".

Zum besseren Verständnis wollen wir an einem Beispiel das Gesagte erläutern:

Wir fanden für Originalurin: S 1 = 76,9 Tropfen, nach Behandeln des gleichen Urins mit Kohle S 0 = 71,3 Tropfen; der „Quotient" ist also $\frac{S\,1}{S\,0} = \frac{76{,}9}{71{,}3} = 1{,}07$ Nun wurde eine Probe des gleichen Urins mit HCl bis zum Umschlag versetzt. Wir fanden dann für diesen Urin die Tropfenzahl S 1 = 84,7; dann wurde der Urin wieder mit Kohle „entkolloidet", nun gab er die Tropfenzahl S 0 = 71,6; der „Säurequotient" ist also $\frac{S\,1}{S\,0} = \frac{84{,}7}{71{,}6} = 1{,}182$.

Da die Differenzen der einzelnen stalagmometrischen Quotienten erst in der 1.—3. Dezimalen markant zum Ausdruck kommen, so berücksichtigen wir beim Lesen stets erst die Zahlen nach dem Komma, wir lesen also in dem oberen Beispiel 71 statt 1,071, 182 statt 1,182.

Bei den später zur Beurteilung kommenden normalen und pathologischen Urinen lassen sich zunächst Vergleiche ziehen nur zwischen den „Säurequotienten"; nur sie sind aus vergleichbaren Flüssigkeiten gewonnen. Wenn wir trotzdem auch den „Quotienten" anführen, so liegt der Grund in folgendem:

Durch den Zusatz von H-Ionen wird die Oberflächenaktivität der stalagmometrisch wirksamen Stoffe verändert, und zwar, wie ein Blick in die Tabelle III erweist, in ganz verschiedenem Grad. Die Bedeutung dieses Einflusses vermögen wir heute noch nicht zu übersehen und behalten uns vor, in einem vorgeschrittenen Stadium darauf zurückzukommen. Der „Quotient" kommt um so mehr für uns in Betracht, als wir für Normalurine bereits eine Höhe für ihn gefunden haben, die nicht überschritten zu werden scheint (s. Tab. V).

Digitized by Google

Den Ausfall dieser beiden so gefundenen „stalagmometrischen Quotienten" stellten wir zunächst an einer Reihe von Normalurinen fest, d. h. Urinen von gesunden Personen bzw. Patienten, die an völlig indifferenten oder abgelaufenen Erkrankungen litten, deren Urinbefund jedenfalls bei üblicher klinischer Untersuchung völlig normal war. Ferner wurden einige Male auch künstlich hergestellte Gemische untersucht. Weiterhin gingen wir dann dazu über, bestimmte Krankheitsgruppen bzw. von der Norm abweichende Organismusveränderungen in der gleichen Weise zu untersuchen und verglichen diese Ergebnisse dann mit den bei Normalurinen gefundenen.

I. Normalurine.

Wir verfügen im ganzen über 20 Fälle, deren Versuchsergebnisse die folgende Tabelle zeigt.

Tabelle V.

Normalurine, spez. Gewicht 1010.

Name	Diagnose	Urinbefund	Tropfenzahl		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin		Verbrauchte Säure bei Schütteluria gegenüber gew. Urin in %	Stalagmometrischer Quotient
			Urin	Schütteluria	Urin	Schütteluria		
1. W.	Ren mobilis	normal	76,6	72				1,063
		Reaktion: sauer	84,8	72,3	0,11	0,07	63,6	1,172
2. Dr. S.	gesund	normal	78,1	72,8				1,072
		Reaktion: sauer	82,7	71,2	0,06	0,04	66,6	1,161
3. K.	Neurasthenie	normal	77,3	70,2				1,101
		Reaktion: sauer	90,4	70,5	0,11	0,04	36,3	1,182
4. K.	Polymyositis abgelaufen	normal	72,5	69,7				1,041
		Reaktion: sauer	79,1	70,9	0,06	0,04	66,6	1,115
5. Schm.	Grippe (Temp. norm.) abgelaufen	normal	73,9	71,7				1,031
		Reaktion: sauer	81,5	71,2	0,05	0,04	80	1,144
6. Schm.	Tbc. inveterata Temp. normal	normal	74	71,3				1,039
		Reaktion: sauer	80,4	71,6	0,06	0,04	66,6	1,122
7. G.	Bronchitis abgelaufen	normal	73,9	72				1,026
		Reaktion: sauer	81,3	71,4	0,04	0,04	100	1,138

Digitized by Google

Tabelle V (Fortsetzung).

Name	Diagnose	Urinbefund	Tropfenzahl Urin	Tropfenzahl Schütteliurin	Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin: Urin	Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin: Schütteliurin	Verbrauchte Säure bei Schüttelurin gegenüber gew. Urin in %	Stalagmometrischer Quotient
8. M.	gesund	normal	74,8	71,6				1,047
		Reaktion: sauer	85,5	71,6	0,07	0,05	71,4	1,194
9. Pf.	Diagnose zunächst unsicher später Typhus	normal	75,4	71				1,062
		Reaktion: sauer	90,1	69,9	0,09	0,04	44,4	1,288
10. B.	gesund	normal	72,5	71,1				1,019
		Reaktion: sauer	78,3	71,1	0,05	0,04	80	1,101
11. O.	gesund	normal	72,5	71,1				1,019
		Reaktion: sauer	78,2	71,2	0,06	0,04	66,6	1,098
12. Sch.	gesund	normal	77,6	71,1				1,091
		Reaktion: sauer	88,3	70,6	0,06	0,04	66,6	1,250
13. P.	gesund	normal	75,5	69,9				1,080
		Reaktion: sauer	82	71	0,05	0,04	60	1,154
14. L.	gesund	normal	73,1	70,9				1,031
		Reaktion: sauer	82	70,8	0,07	0,05	71,4	1,158
15. O.	Muskelrheumatism. abgelaufen	normal	74,1	71,8				1,032
		Reaktion sauer	80,7	72,2	0,07	0,04	57,1	1,117
16. H.	gesund	normal	75,3	71,4				1,054
		Reaktion: sauer	85,2	71,5	0,05	0,04	80	1,191
17. K.	Ischias	normal	74,4	71,7				1,037
		Reaktion: alkalisch	86,3	71,9	0,14	0,09	64,2	1,200
18. Prof. B.	gesund	normal	73,2	71,1				1,029
		Reaktion: sauer	77,1	71,2	0,05	0,04	80	1,082
19. Dr. R.	gesund	normal	72,9	71,3				1,022
		Reaktion: sauer	80	71,6	0,09	0,07		1,117
20. Dr. K.	gesund	normal	74,4	71,6				1,039
		Reaktion: sauer	83,9	71,9	0,18	0,14	77,7	1,166

Digitized by Google

Betrachtet man bei den einzelnen Versuchen den „stalagmometrischen Quotienten“ als die für uns maßgebende Zahl, so sieht man, daß jedesmal zwischen dem „Quotienten“ und dem „Säurequotienten“ ein Emporschnellen festzustellen ist. Dabei übersteigt der „Säurequotient“ jedoch die Zahl 200 nicht mit Ausnahme zweier Fälle, während der „Quotient“ meist weit unter 100 bleibt. Von den zwei abweichenden Fällen handelte es sich einmal um einen gesunden Wärter der Klinik, das andere Mal um eine Patientin, die sich am Tage der Urinentnahme völlig gesund fühlte, normale Temperatur und Organbefund hatte, und die wir bald entlassen wollten. Am nächsten Tage bekam sie jedoch einen hohen Fieberanstieg, der sich nach Abfall noch öfter wiederholte, bis schließlich nach 14 Tagen die bakteriologische Diagnose Typhus abdominalis gestellt werden konnte.

Mit Versuchen, die den Ausfall der „stalagmometrischen Quotienten“ zu verschiedenen Tageszeiten in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme bei Normalurinen zeigen, sind wir z. Zt. beschäftigt.

II. Gallenfarbstoff-Urine.

Es ist bekannt, daß Galle eine starke Erniedrigung der Oberflächenspannung herbeiführt, und da diese von Einfluß auf den Ausfall des „stalagmometrischen Quotienten“ sein muß, so war von vornherein eine Änderung gegenüber dem bei Normalurinen gefundenen zu erwarten. Aus der folgenden Tabelle gehen unsere Versuchsergebnisse hervor.

Tabelle VI.

Name	Diagnose	Urinbefund	Tropfenzahl		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin		Verbrauchte Säure beim Tierkohleurin gegenüber gew. Urin in %	Stalagmometrischer Quotient
			Urin	Schütt-telurin	Urin	Schütt-telurin		
1. K.	Icterus	Urobilin ++	64,3	50,6				1,271
	catarrhal.	Reaktion: alkalisch	74,4	50,7	0,22	0,08	36	1,465
2. W.	Grippe?	Urobilin +	57,2	50,1				1,141
		Albumen + Reaktion: neutral	69,4	51	0,24	0,12	50	1,361
3.		Alb. Spur	61	51				1,196
		Urobilin + Reaktion: neutral	67	51	0,1	0,05	50	1,313
4. T.	Icterus	Urobilin +	63,9	50,5				1,265
		Gallenfarbstoff + Reaktion: sauer	70,2	50,8	0,11	0,09	81,8	1,381
5. L.	Icterus	Urobilin +	82,3	71,5				1,151
	catarrhal.	Gallenfarbstoff + Reaktion: schwach alkalisch	96,1	71,7	0,15	0,11	73,3	1,340

Digitized by Google

Tabelle VI (Fortsetzung).

Name	Diagnose	Urinbefund	Tropfenzahl		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin		Verbrauchte Säure beim Tierkohleurin gegenüber gew. Urin in %	Stalagmometrischer Quotient
			Urin	Schüttelurin	Urin	Schüttelurin		
6. W.	Lungentuberculose	Urobilin + Urobilinogen + Reaktion: alkalisch	81 99,9	70,9 70,8	0,15	0,09	60	1,142 1,411
7. V.	Typhus (Temp. 39—40)	Urobilin + sonst o. B. Reaktion: alkalisch	76,5 90,9	71,5 71,1	0,1	0,07	70	1,069 1,278
8. L.	Scharlach (Temp. 38—40)	Urobilin + Alb. Spur sonst o. B. Reaktion: schwach alkalisch	78,9 94,6	71,8 72	0,08	0,06	75	1,098 1,312
9. W.	? (Temp. 39,4)	Urobilin + Urobilinogen + sonst o. B. Reaktion: alkalisch	75,6 90,7	71,2 71,3	0,06	0,04	66,6	1,061 1,272
10. Sch.	Typhus (Temp. 39)	Alb. Trbg. Urobilin + Reaktion: sauer	82,7 93	71,1 71,5	0,05	0,04	60	1,163 1,300
11. G.	Angina follicular. (Temp. 38,5)	Urobilin + sonst o. B. Reaktion: sauer:	79,5 91,9	71,6 71	0,07	0,05	71,4	1,110 1,294
12. P.	Typhus (Temp. 38,5	Urobilin + sonst o. B. Reaktion: sauer	79 94,8	71,3 71,2	0,08	0,05	62,5	1,107 1,331
13. O.	gesund klinisch	Urobilin + Alb. Spur Sed.: reichl. Leukoc. vereinzelt Erythrocyten u. Epith.	75,5 91,6	70,7 71,4	0,11	0,09	81,8	1,067 1,282
14. D.	Icterus catarrh.	Urobilin + Urobilinogen + Alb. Spur Sed.: mäßig Leukocyten, keine Cyl.	83,0 98	71,4 71,6	0,4	0,25	62,5	1,162 1,368

Digitized by Google

Betrachten wir die Tabelle genauer, so fällt zunächst beim Vergleich mit den Normalurinen der hohe Stand des „Säurequotienten" in jedem Versuch auf, der als niedrigsten Wert 272, als höchsten 465 zeigt; dies bedeutet eine starke Erhöhung gegenüber dem gleichen bei Normalurinen. Auch in seinem „Quotienten" zeigt der „stalagmometrische Quotient" deutliche Abweichungen von dem bei Normalurinen, er liegt im ganzen ebenfalls sehr viel höher als bei diesem, bewegt sich zwischen 61 als niedrigstem und 271 als höchstem Wert. Dabei ergibt sich, daß die höchsten Werte für den „Quotienten" und den „Säurequotienten" sich bei den an Icterus erkrankten Personen finden, also da, wo die Schädigung der Leberfunktion im Vordergrund steht (s. Versuch 1, 4, 5 der Tabelle). Jedoch finden sich auch in anderen Krankheitsfällen, wofern nur eine Leberfunktionsstörung durch das Vorhandensein von Urobilin im Urin zum Ausdruck kommt, abnorm hohe Zahlen (Versuch 6 der Tabelle). Die niedrigsten Werte namentlich für den „Quotienten", jedoch auch für den „Säurequotienten" finden sich fast durchweg bei den Fällen, in denen die Leberfunktionsstörung nicht im Vordergrund des klinischen Bildes steht, bei denen sich nur bei andersartiger Infektion eine Beteiligung der Leber durch Urobilinausscheidung im Harn zu erkennen gibt (Versuch 7, 8, 9, 11, der Tabelle). bzw. sich bei einem sich gesundfühlenden Wärter zufällig im Urin Urobilin fand (Versuch 13 der Tabelle).

Wieweit bei diesem Ergebnis unserer Untersuchungen die Menge des ausgeschiedenen Urobilins, bzw. der Grad der Funktionsstörung eine Rolle spielt, können wir nicht ohne weiteres entscheiden. Möglich ist durchaus auch, daß die Infektionskrankheit als solche (Typhus bzw. Scharlach usw.) auch ohne klinisch nachweisbare Gallenfarbstoffausscheidung im Urin eine gleichsinnige Veränderung des „stalagmometrischen Quotienten" zeigt. Dazu müßten wir Urine von Infektionskranken untersuchen, die keine Gallenfarbstoffausscheidung zeigen, bei denen auch andere bekannte oberflächenspannungsverändernde Momente fortfallen. Wir behalten uns derartige Untersuchungen vor.

Wir folgern also: Gallenfarbstoffhaltige Urine zeigen in mehr oder weniger hohem Grade jedoch regelmäßig eine starke Erhöhung des „stalagmometrischen Quotienten."

III. Nephrosen.

Wir verfügen hier nur über 5 Fälle, deren Versuchsergebnis die folgende Tabelle zeigt.

Trotz der geringen Zahl der Fälle läßt uns der Ausfall der Versuche doch einen Einblick tun und berechtigt uns zu Schlüssen in der Richtung, die uns bei unserer Fragestellung interessieren. Die Schwierigkeit bei der Untersuchung dieser Urine lag in allen Fällen darin, daß wir durch Adsorption den Urin nicht völlig klar bekamen, das Eiweiß nicht völlig entfernt wurde. Es müssen hier besondere Umstände vorliegen, die eine völlige Adsorption verhindern, die Menge etwa des Eiweißes kann es nicht sein, da Nephritiden bei gleichem Eiweißgehalt, wie wir später noch sehen

Digitized by Google

Tabelle VII.

Name	Diagnose	Urinbefund	Tropfenzahl		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin		Verbr. Säure beim Tierkohleurin gegenüber d. gew. Urin in %	Stalagmometrischer Quotient
			Urin	Schütttelurin	Urin	Schütttelurin		
1. H.	Nephrose	Esb. 3/4 ‰, Sed.: reichlich Leuk., gran. und hyal. Cyl.	84 100,9	71,5 75,7	0,09	0,05	55,5	1,174 1,332
2. K.	Nephrose	Esb. 3 ‰, Sed.: reichlich weiße Blutk., einzelne Epithel., hyal. Cyl., Blutdruck normal.	74 91,9	71,1 77,3	0,19	0,15	78,9	1,040 1,188
3. H.	Nephrose (Gravide mens IV)	Esb. 3 ‰, Sed.: hyal. und gran. Cyl., einzelne Erythroc. und Leukocyten u. Epithelien.	75,2 97,6	71,5 77,5	0,12	0,09	75	1,051 1,259
4. a) H.	Nephrose (Gravide mens VI)	Esb. 11,5 ‰, Urobil. +, sonst chemisch o. B. Sed.: viel Detritus, Kryst., hyal. Cyl., vereinzelt Erythroc., Leukoc.	76,8 97,1	72,5 80	0,46	0,34	73,4	1,059 1,213
b)	gleicher Urin enteiweißt (auf 200 ccm Urin 100 Liq. ferri oxydat.	Albumen 0.	79,8 90,6	70,6 72	0,16	0,12	75	1,130 1,241
5. E.	Nephrose	Esb. 5 ‰ (spez. Gewicht 1024). Eßb. 3 ‰ (spez. Gewicht 1010). Sed.: vereinz. hyal. Cyl., vereinzelt Leukoc. und Epithelien.	84,7 96,9	73,4 81,1	0,3	0,18	60	1,153 1,194

werden, nichts Derartiges zeigten, sondern ungefähr das Verhalten des Normalurins ergaben, d. h. in dem Tierkohle-Schüttelurin zeigt sich auf H-Ionenvermehrung keine Änderung der Oberflächenspannung gegenüber dem gewöhnlichen Schüttelurin. Es müssen vielmehr oberflächenaktive Stoffe vorhanden sein, die in erster Linie von der Kohle adsorbiert

Digitized by Google

werden und die Adsorption des Farbstoffes verhindern oder ihn gar verdrängen.

Bei unsern Nephrose-Urinen zeigte sich im Gegensatz dazu auch bei dem adsorbierten Urin auf Säurezusatz eine Beeinflussung der Oberflächenspannung im Sinne einer Erniedrigung, d. h. Tropfenvermehrung, und diese führt ihrerseits wieder zu einer Beeinflussung des „stalagmometrischen Quotienten", indem sie seinen Wert herabdrückt, niedriger setzt.

Trotzdem liegt der „stalagmometrische Quotient", namentlich der „Säurequotient" in allen Fällen mit einer Ausnahme (V. 2 der Tabelle) oberhalb der normalen oberen Grenze, und auch der „Quotient" ist einige Male erhöht.

Daß diese Erhöhung des „stalagmometrischen Quotienten" zum mindesten nicht allein durch das Eiweiß — ob nun Albumin oder Albumosen bleibt vorläufig noch ungeklärt (wir verweisen auf aunsere Untersuchungen der folgenden Gruppe) — bedingt ist, das zeigt sehr schön Versuch 4a und b der Tabelle, wo der gleiche Urin nach Enteiweißen mit Liquor ferr. oxydat. ebenfalls noch die Erhöhung des „stalagmometrischen Quotienten" zeigt und zwar in noch höherem Grade als der eiweißhaltige. Letzteres ist aber, wie wir schon oben angedeutet haben, darauf zurückzuführen, daß die nicht völlige Adsorption des geschüttelten Urins den „stalagmometrischen Quotienten" nicht zur völligen Auswertung kommen läßt.

Aus den Versuchen ergibt sich, daß nephrotische Urine stets eine Erhöhung wenigstens des einen der beiden „stalagmometrischen Quotienten" bzw. einen an der oberen Grenze des normalen liegenden zeigen.

IV. Nephritiden.

Bei dieser Krankheitsgruppe verfügen wir vorläufig über 5 Versuche, deren Ausfall die folgende Tabelle zeigt.

Tabelle VIII.

Name	Diagnose	Urinbefund	Tropfenzahl		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin		Verbr. Säure beim Tierkohleurin gegenüber gew. Urin in %	Stalagmometrischer Quotient
			Urin	Schütteleurin	Urin	Schütteleurin		
1. G.	Glomerulonephritis. Blutdruck normal	Alb. 0,6‰, Reakt.: sauer	73,7 90,4	70,8 71	0,04	0,04	75	1,040 1,273
2. D.	Glomerulonephritis. Blutdruck ca. 150 syst.	Alb. 2‰, Reaktion: alkalisch. Sed.: reichlich Cyl., rote u. weiße Blutk.	77,8 94,6	71,1 73,9	0,17	0,09	52,9	1,094 1,280

Digitized by Google

Tabelle VIII (Fortsetzung).

Name	Diagnose	Urinbefund	Tropfenzahl		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin		Verbr. Säure beim Tierkohleurin gegenüber gew. Urin in %	Stalagmometrischer Quotient
			Urin	Schüttelurin	Urin	Schüttelurin		
3. W.	Glomerulonephritis	Alb. 7‰ Esbach. Reakt.: sauer. Sed.: rote u. weiße Blutk., Cyl.	93,4 94,7	71 70,9	0,07	0,04	57,1	1,315 1,335
4. D.	Glomerulonephritis	Esbach 0,7‰, Blut + Sed.: reichl. Erythr., Leuk. gran. u. hyal. Cyl.	82,2 99,8	71,1 71,5	0,11	0,08	72,7	1,156 1,395
5. G.	Pneumonie. Temp. 38,2 rect.	Alb. Spur, Sed.: vereinz. gran. Cyl. u. Erythroc. Reaktion: sauer	83,6 96,8	71,3 71,5	0,08	0,05	62,5	1,172 1,353

Die Tabelle zeigt in allen Fällen in hervorragendem Maße eine Erhöhung des „stalagmometrischen Quotienten" sowohl des „Quotienten" als auch des „Säurequotienten". Der niedrige Ausfall des „Quotienten"

Tabelle IX.

(Mit Serumzusatz.)

Esbach ‰		Tropfenzahl		Tropfenzahl Tierkohle-Schüttelurin		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin (Umschlag Methylorange or. Congo hellbl.)		Stalagmometrischer Quotient	
		ohne S.	mit S.	ohne S.	mit S.	Urin	Tierkohle-Schütteluriu	ohne S.	mit S.
—	1. Gewöhnl. Urin	72,2	81,4	71	70,5	0,08	0,06	1,016	1,154
1/8	2. Urin + 1‰ Ser.	72,7	86,6	70,8	70,9	0,09	0,06	1,026	1,221
0,25	3. Urin + 2‰ Ser.	72,4	88	71,5	71,4	0,09	0,06	1,012	1,232
etw. mehr als 0,25	4. Urin + 3‰ Ser.	72,4	88,9	71,2	71	0,09	0,06	1,016	1,252
zw. 0,25 u. 0,5	5. Urin + 5‰ Ser.	73,1	88,8	70,6	70,8	0,09	0,06	1,035	1,254
0,7	6. Urin + 10‰ Ser.	74,5	89,7	70,6	71,2	0,09	0,06	1,055	1,259
1,0	7. Urin + 20‰ Ser.	75,7	91	71	—	0,09	0,06	1,066	—
2,0	8. Urin + 30‰ Ser.	76,1	91,6	70	70,5	0,09	0,06	1,087	1,299
3,2	9. Urin + 40‰ Ser.	75,1	91	70,2	71,1	0,09	0,09	1,069	1,279
4,0	10. Urin + 50‰ Ser.	76,7	91,8	71,1	72,7	0,09	0,1	1,078	1,262
7,0	11. Urin + 70‰ Ser.	77,9	92,6	71,1	73,6	0,09	0,1	1,095	1,258
6,25	12. Urin + 90‰ Ser.	78,4	93,4	71,5	72,5	0,09	0,1	1,096	1,288
7,2	13. Urin + 100‰ Ser.	78,1	94,5	71,5	73,1	0,09	0,1	1,092	1,292

Digitized by Google

Tabelle X.

(Mit Witte-Peptonzusatz).

	Tropfenzahl Urin		Tropfenzahl Tierkohle-Schüttelurin		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin (Umschlag Methylorange or. Congo hellbl.)		Stalagmometrischer Quotient	
	ohne S.	mit S.	ohne S.	mit S.	Urin	Schüttelurin	ohne S.	mit S
1. Gewöhnl. Urin	72,6	83,9	71	71,1	0,1	0,07	1,022	1,180
2. Urin + 0,1‰ Pept.	72,5	83,0	71,9	72,1	0.16	0,21	1,008	1,151
3. Urin + 0,2‰ Pept.	73,1	83,7	72,3	72,3	0,22	0,21	1,010	1,157
4. Urin + 0,3‰ Pept.	73,1	84	—	72	0,29	0,21	—	1,166
5. Urin + 0,5‰ Pept.	72,9	83,5	71,8	71,9	0,35	0,21	1,015	1,161
6. Urin + 1‰ Pept.	73,5	84,6	71,1	71,2	0,40	0,21	1,033	1,188
7. Urin + 2‰ Pept.	73,9	85	71,6	71	0,43	0,21	1,032	1,197
8. Urin + 3‰ Pept.	75,6	86,1	71	70,9	0,46	0,21	1,064	1,214
9. Urin + 4‰ Pept.	76,5	87,4	71,2	71,8	0,48	0,21	1,074	1,217
10. Urin + 5‰ Pept.	79,2	88,9	70,1	70,9	0.49	0,22	1,129	1,253
11. Urin + 7‰ Pept.	79,7	89,4	71	71,1	0,51	0,25	1,122	1,257
12. Urin + 9‰ Pept.	80,1	89,7	72,3	72,2	0,52	0,27	1,107	1,242
13. Urin + 10‰ Pept.	83,4	92,1	70,7	70,8	0,53	0,29	1,179	1,300

bei Versuch 1 erklärt sich aus der in diesem Falle stärkeren Verdünnung des Urins, der sich infolgedessen in seiner Oberflächenspannung mehr dem Wasserwerte nähert, was sich beim „stalagmometrischen Quotienten" nach obigen Ausführungen bemerkbar machen muß.

Wir suchten nun weiterhin bei diesen Fällen die Frage zu entscheiden, ob bei Normalurinen, denen Albumine bzw. Witte-Pepton (Albumosen) in steigender Menge zugesetzt waren, sich ebenfalls eine Beeinflussung des „stalagmometrischen Quotienten" zeigt. Wir gingen dabei so vor, daß wir einmal dem Normalurin steigende Mengen eines Serums zusetzten und dieser außerdem kontrolliert wurde durch Eßbach. Bei Witte-Pepton, das ja im wesentlichen aus Albumosen besteht und kaum Peptone enthält, gingen wir von 10proz. Lösungen aus, so daß der Trockengehalt ein ähnlicher war wie bei Serumlösungen.

Die beiden Tabellen IX und X zeigen das Ergebnis dieser Versuche.

Betrachten wir zunächst Tabelle IX (Serum) genauer, so zeigt sich gleich mit niedrigen Serumzulagen beginnend eine langsames Steigen des „stalagmometrischen Quotienten", dem in mittleren Lagen ein geringes Fallen und zum Schluß mit weiter steigender Serumkonzentration wieder ein Steigen des „stalagmometrischen Quotienten" folgt. Das geringe Absinken des „Quotienten" bei niedrigen Serummengen möchten wir vorläufig als in der Fehlerbreite begründet liegend betrachten.

Tabelle X (Witte-Pepton) zeigt in den niedrigen Konzentrationen zunächst ein Abfallen des „stalagmometrischen Quotienten", es folgt dann langsam das Sichwiedereinstellen auf den Grundwert und von da ab ein langsames kontinuierliches Steigen des „stalagmometrischen Quotienten", das im allgemeinen bis zum Schlusse der von uns gewählten Konzentration anhält.

Digitized by Google

Die Versuche mit Albuminen und Albumosen zeigen also zunächst, daß die Oberflächenspannung und damit auch der „stalagmometrische Quotient" beeinflußt werden, daß nämlich steigende Mengen von Albuminen bzw. Albumosen den „stalagmometrischen Quotienten" erhöhen.

Um zu erfahren, ob diese eben genannten Eiweißkörper zu einer physiologischen NaCl-Lösung zugesetzt sich gleichsinnig verhielten, wie in Urinen, setzten wir die gleichen Versuche mit einer physiologischen NaCl-Lösung an und kamen zu folgendem Ergebnis:

Tabelle XI. (Mit Serumzusatz.)

Esbach ‰		Tropfenzahl NaCl		Tropfenzahl Tierkohleschüttel-NaCl		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm NaCl (Umschl. Methylor. or. Congo hellblau)		Stalagmometrischer Quotient	
		ohne S.	mit S.	ohne S.	mit S.	NaCl	Tierkohleschütt.-NaCl	ohne S.	mit S.
	Physiolog. NaCl-Lösung								
ca. 1/8	1. + 1‰ Serum	71	72,1	72	72,2	0,04	0,02	0,986	0,998
unter 1/4	2. + 2‰ Serum	71	73	72,1	71,5	0,04	0,02	0,984	1,020
1/4	3. + 3‰ Serum	71	73,8	71,2	71,4	0,04	0,02	0,997	1,032
1/4 1/2	4. + 5‰ Serum	71,5	75,8	71,2	71,5	0,04	0,03	1,004	1,060
3/4	5. + 10‰ Serum	72,2	77,2	70	71,1	0,04	0,03	1,030	1,085
1,2	6. + 20‰ Serum	72,6	79,5	71,3	71,2	0,05	0,04	1,018	1,116
2,8	7. + 30‰ Serum	73	81,3	71	71,3	0,06	0,05	1,028	1,140
2,5	8. + 40‰ Serum	73,2	79,7	71	71,7	0,08	0,06	1,039	1,111
4,7	9. + 50‰ Serum	72,5	78,8	71,1	71,6	0,09	0,07	1,019	1,100
7,5	10. + 70‰ Serum	73,8	82	71	72,6	0,12	0,09	1,039	1,129
	11. + 90‰ Serum	75,5	87	73,5	77,7	0,12	0,09	1,027	1,119
	12. + 100‰ Serum	76,6	92,1	73,2	77,7	0,13	0,1	1,046	1,187

Tabelle XII. (Mit Witte-Peptonzusatz).

	Tropfenzahl NaCl		Tropfenzahl Tierkohleschüttel-NaCl		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm NaCl (Umschl. Methylor. or. Congo hellblau)		Stalagmometrischer Quotient	
	ohne S.	mit S.	ohne S.	mit S.	ohne S.	mit S.	ohne S.	mit S.
1. physiolog. CaCl.	71	71,2	71	71,2	—	—	1,000	1,000
2. + 0,1‰ Pepton	70,3	71,1	70,6	71,6	0,05	0,04	0,995	0,993
3. + 0,2‰ Pepton	70,9	71,0	71,3	71,6	0,05	0,04	0,994	0,991
4. + 0,3‰ Pepton	70	70,5	70	71,1	0,05	0,04	1,0	0,991
5. + 0,5‰ Pepton	70,5	70,8	70,1	71,2	0,05	0,04	1,005	0,994
6. + 1‰ Pepton	71,6	72,6	71,1	72,3	0,05	0,04	1,007	1,004
7. + 2‰ Pepton	70,7	72,8	70,1	70,2	0,12	0,04	1,008	1,037
8. + 3‰ Pepton	71,6	74,9	69,5	70,3	0,05	0,04	1,030	1,065
9. + 4‰ Pepton	71,7	75,8	—	—	0,05	—	—	—
10. + 5‰ Pepton	74,3	79	70,6	71	0,18	0,05	1,052	1,112
11. + 7‰ Pepton	74,8	80,1	71	71,1	0,22	0,05	1,053	1,126
12. + 9‰ Pepton	78	82	71,3	71,3	0,08	0,04	1,098	1,150
13. + 10‰ Pepton	77,7	82,9	71,6	71,6	0,13	0,05	1,085	1,157

Digitized by Google

Beim Serumzusatz (Tabelle XI) zeigt sich für den „Säurequotienten" ein gleichsinniges Verhalten wie beim Urin (Tabelle 9), nur daß das Sinken des „stalagmometrischen Quotienten" mit folgendem Steigen etwas weiter nach der höheren Konzentration hin verschoben ist. Bei dem „Quotienten" zeigt sich im Gegensatz zu Tabelle IX in den mittleren Serumzulagen ein starkes Hin- und Herschwanken im allgemeinen mit erniedrigender Tendenz, um zum Schluß auch wieder wie beim Urin zu steigen. Auffallend ist noch, daß erst höherer Serumzusatz die Tropfenzahl vermehrt, während man theoretisch gerade schon von sehr geringem Eiweißzusatz eine erhebliche Verminderung der Oberflächenspannung erwarten sollte.

Albumosenzusatz (Tabelle XII) zeigt ein gleichsinniges Verhalten des „stalagmometrischen Quotienten" wie beim Urin (Tabelle 10), d. h. nach einem geringen Absinken bei niedrigem Zusatz folgt ein kontinuierliches Steigen des „stalagmometrischen Quotienten", das bis zum Schluß anhält. Auch in diesem Versuch zeigt sich ein merkwürdiges Verhalten der Oberflächenspannung, indem bei geringem Albumosenzusatz zunächst eine Erhöhung, d. h. Tropfenverminderung, bei stärkerem Zusatz dann eine langsame, aber stetig zunehmende Oberflächenspannungsverminderung, d. h. Tropfenvermehrung, eintritt.

Vergleichen wir die Nephritis-Urine mit den mit Serum bzw. Albumosen versetzten Normalurinen, so sehen wir zwar auch bei letzteren den auf den „stalagmomertischen Quotienten" erhöhenden Einfluß deutlich, jedoch erreicht er nicht die bei Nephritis gefundenen Werte, so daß wir daraus schließen müssen, es sind noch andere unbekannte Einflüsse, die zu der starken Erhöhung des „stalagmometrischen Quotienten" führen.

V. Pyelitiden bzw. Pyelonephritiden.

In dieser Gruppe stehen uns 6 Versuche zur Verfügung, wovon sich 4 auf Pyelonephritiden beziehen, die bei derselben Versuchsperson zu verschiedenen Zeiten angestellt wurden (s. Tabelle XIII).

Auch hier sehen wir in den reinen Pyelitisfällen wieder das teilweise erhebliche Ansteigen des „stalagmometrischen Quotienten"; bei den Pyelonephritiden zeigt sich in 2 Fällen keine Erhöhung desselben, in allen Fällen jedoch hier die gleiche Eigentümlichkeit wie bei der Nephrose, daß nämlich durch die Tierkohleadsorption keine völlige Entfärbung des Filtrats eintrat, es blieben noch Stoffe in ihm, die bei H Ionenvermehrung zu einer Erniedrigung der Oberflächenspannung führten, was bei völlig entfärbtem, also praktisch restlos adsorbiertem Filtrat nicht der Fall war. Dadurch wurde die Höhe des „stalagmometrischen Quotienten", wie schon oben ausgeführt, beeinträchtigt, er wäre im anderen Fall bedeutend höher ausgefallen, wie sich aus der sehr starken Oberflächenspannungsverminderung des gewöhnlichen Urins ergibt, dessen H-Ionengehalt vermehrt ist.

VI. Cystitis.

Bisher hatten wir nur Gelegenheit zu einem Versuch, der folgendermaßen ausfiel (s. Tabelle XIV):

Digitized by Google

Tabelle XIII.

Name	Diagnose	Urinbefund	Tropfenzahl		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin		Verbr. Säure beim Tierkohleurin gegenüber gew. Urin in %	Stalagmometrischer Quotient
			Urin	Schütteĺurin	Urin	Schütteĺurin		
1. B.	Pyelitis (Paracoli)	Albumen θ, Esbach unter $^{1}/_{4}$ ‰, massenhaft Leukoc. u. Epithelien	59,8 70	50,7 51	0,28	0,17	60,7	1,179 1,372
2. G.	Pyelonephritis	Esbach $3^{3}/_{4}$ ‰, Leukoc., Erythrocyten gran. u. hyal. Zyl., Epithelien	54,1 69,7	51,1 62,8	0,33	0,23	69,6	1,058 1,109
3. G.	Pyelonephritis	Esbach 5 ‰, Sediment wie bei 2.	74,1 92	72,6 79,5	0,14	0,09	64,2	1,020 1,157
4. G.	Pyelonephritis	Esbach 3,5 ‰, Sediment wie bei 2.	76,2 95,7	72,1 79,2	0,08	0,06	75	1,056 1,208
5. G.	Pyelonephritis	Esbach 3,5 ‰, Sediment wie bei 2.	81,8 102,6	72,8 79,8	0,16	0,12	75	1,123 1,285
6. M.	Pyelitis	Albumen θ, Sedim.: zieml. viel Leukoc. und Epithel.	78,1 86,8	71,3 71,2	0,07	0,05	71,4	1,095 1,219

Tabelle XIV.

Name	Diagnose	Urinbefund	Tropfenzahl		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin		Verbrauchte Säure beim Tierkohleurin gegenüber gew. Urin in %	Stalagmometrischer Quotient
			Urin	Schütteĺurin	Urin	Schütteĺurin		
1. B.	Cystitis	Albumen 0 Reaktion: sauer	79,3 97,5	71,1 71,4	0,07	0,04	57,1	1,114 1,365

Auch hier tritt uns wieder die starke Erhöhung des „stalagmometrischen Quotienten" besonders des „Säurequotienten" entgegen, jedoch auch der „Quotient" ist gegenüber normalen Verhältnissen erhöht.

Die Oberflächenspannung zeigt besonders bei dem gewöhnlichen Urin mit H-Ionenvermehrung eine weit über die Norm hinausgehende Erniedrigung der Oberflächenspannung, also Erhöhung der Tropfenzahl.

Digitized by Google

VII. Schwangerschaftsurine.

Wir untersuchten 5 Urine, die ich der Freundlichkeit von Herrn Privat-Dozent Dr. Eckelt von der hiesigen Frauenklinik verdanke, mit folgendem Ergebnis:

Tabelle XV.

Name	Diagnose	Urinbefund	Tropfenzahl		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin		Verbr. Säure beim Tierkohleurin gegenüber gew. Urin in %	Stalagmometrischer Quotient
			Urin	Schüttelurin	Urin	Schüttelurin		
1. T.	Gravid. mens. IX	Esbach ca. $^1/_8$ ‰, Sedim.: vereinz. Erythrocyten u. Epithelien, viel Leukocyten	78,8 95,6	72 72,3	0,25	0,18	72	1,094 1,322
2. H.	Gravid. mens. VII	Alb.: $^1/_2$ ‰ Esbach, Sed.: viel Leukoc., mäßig Erythrocyten	78,8 93,3	71,6 72,3	0,36	0,24	66,6	1,100 1,290
3. T.	(s. 1)	Esb. $^1/_4$ ‰, (sp. Gew. 1023) Esbach $^1/_8$ ‰ (sp. Gew. 1010) chemisch o. B. Katheterurin!	86,2 99,8	71,9 71,8	0,27	0,20	74	1,184 1,289
4. L.	Gravid. mens. IX	Alb. θ, chemisch o. B. Sed.: 1 gr. Zyl., vereinzelt Erythrocyten, Leukocyten u. Epithelien, Katheterurin!	85,2 99,7	72,4 73,2	0,22	0,18	81,8	1,176 1,362
5. B.	Gravid. mens. VI	Alb. Spur, Esbach θ (völlig neg.) Urobilin + Katheterurin!	89,2 103	71,5 72	0,25	0,17	68	1,247 1,430

In sämtlichen Fällen erscheint wieder die starke Erhöhung des „stalagmometrischen Quotienten". Bei der Betrachtung der Urinbefunde zeigt sich allerdings in den meisten Fällen ein wenn auch nur geringer Eiweißgehalt, bzw. einmal Urobilingehalt des Urins, die ja beide, wie Versuche im vorhergehenden zeigten, quotienterhöhend wirken. Wieweit diese Bestandteile zur Erhöhung des „stalagmometrischen Quotienten" beitragen, bzw. ob sie ihn in den Fällen allein bedingen, vermögen wir jetzt noch nicht mit Sicherheit zu entscheiden. Daß sie aber zum mindesten nicht das allein Wirksame sind, ergibt sich mit Evidenz aus Versuch 4 der Tabelle, in dem wir einen chemisch negativen Urin haben, der jedoch ebenfalls eine starke Erhöhung des „stalagmometrischen Quotienten" zeigt.

Digitized by Google

Savaré[2]) fand bei seinen Untersuchungen des Frauenharns unter normalen und pathologischen Verhältnissen für normale Harne im Mittel 0,44 g pro Liter adialysable Substanz, bei Schwangeren 0,6 g im Mittel; er mißt dieser geringen Vermehrung jedoch anscheinend keine Bedeutung bei, wenn er aus seinen gefundenen Werten den Schluß zieht, daß sich der Gehalt des Schwangeren-Urins an adialysablen Stoffen in der Regel nicht von dem bei gesunden Frauen unterscheidet. Vielleicht genügen aber doch diese geringen Unterschiede schon, um zur Beeinflussung der Oberflächenspannung und damit des „stalagmometrischen Quotienten" zu führen. Diese Frage mit Hilfe der Ultrafiltration und andere Verfahren in Verbindung mit stalagmometrischen Messungen zu entscheiden, darüber sind z. Zt. im Institut für Kolloidforschung Versuche im Gang. Wir kommen auf diese Frage bei dem folgenden Abschnitt nochmals zurück.

Savaré (s. o.) fand in den eben genannten Untersuchungen bei Urinen von Eklamptischen eine sehr starke Vermehrung der adialysablen Substanzen. Nach Enteiweißen des Urins fand er in 4 Untersuchungen Werte von 2,36; 2,25; 6,97; 4,42 g pro Liter gegenüber im Mittel 0,44 g bei normalen Urinen. Wenn unsere oben geäußerte Vermutung, daß eine Erhöhung des „stalagmometrischen Quotienten" mit der Vermehrung dieser adialysablen Substanzen zusammenhängen könnte, zutrifft, so müßten wir also bei eklamptischen Urinen eine Erhöhung in der Regel zum mindesten finden.

Unsere bisherigen wenigen Versuche geben uns darüber noch keine Auskunft, jedoch werden sie noch erweitert und werden wir später darauf zurückkommen.

IX Fälle, bei denen bisher kein Einfluß auf den „stalagmometrischen Quotienten" gefunden wurde.

Der Vollständigkeit halber wollen wir in dieser Rubrik nur kurz zusammenfassend noch einige Versuche bei anderen Krankheitsgruppen bringen. Zum Teil handelt es sich dabei nur um Einzelversuche, die schon deswegen vorläufig noch ohne besondere Bedeutung sind (s. Tabelle X I).

Die klinische Bedeutung der vorstehend mitgeteilten Untersuchungen (es handelt sich im ganzen um 80 Versuche mit etwa 650 stalagmometrischen Messungen) sehen wir darin, daß es möglich ist, aus dem „stalagmometrischen Quotienten" im Sinne einer Erhöhung zunächst ganz allgemein auf krankhafte Veränderungen bzw. abnorme physiologische Vorgänge im Organismus zu schließen; diese Möglichkeit liegt nach unseren bisherigen Untersuchungen sicher vor für alle Krankheiten, die mit Ausscheidung von Gallenfarbstoffen einhergehen, ferner für Nephrosen, Nephritiden, Pyelitiden und Schwangerschaft. Mit Ausnahme der Schwangerschaft war dieser Ausfall ja auch zu erwarten, allerdings sei hier nochmals betont,



Tabelle XVI.

Name	Diagnose	Urinbefund	Tropfenzahl		Verbrauchte ccm HCl auf 10 ccm Urin		Verbrauchte Säure beim Tierkohleurin gegenüber dem ungew. Urin in %	Stalagmometrischer Quotient
			Urin	Schüttelurin	Urin	Schüttelurin		
		Diabetes.						
1. J.	Diabetes mel.	Sacch. 1,2% Aceton θ.	73,6	70,9				1,038
			83	71,2	0,08	0,06	75	1,165
2. G.	Diabetes mel.	Sacch. 3,6% sonst o. B.	71,3	70,9				1,005
			74,5	70,9	0,05	0,04	66,6	1,050
3. J.	Diabetes mel.	Sacch. 0,5% Aceton + 0,027 Acetessigs. + Alb. θ. Reakt. schw. alkal.	71,3	71,1				1,002
			84,5	72,2	0,1	0,07	70	1,164
4. J.	Diabetes mel.	Sacch. 0,8% Acet. + Acetessigs. +, sonst o. B.	76,9	71,3				1,078
			84,7	71,6	0,05	0,04	80	1,182
		Gelenkrheumatismus.						
1. A.	Gelenkrheumatismus. T. 36,2–38,8.	o. B.	76,9	71,3			·	1,071
			84,7	71,6	0,05	0,04	80	1,182
		Uraemie.						
1. A.	Urämie	Alb. Trbg. Urobilin schw. + Esb. θ. Sed: einz. hyal. Zyl. u. Leukoc. reichl. Epith.	74,8	69,3				1,079
			88	70	0,1	0,07	70	1,257

daß die Höhe des „stalagmometrischen Quotienten" bei diesen Fällen weit über das Maß dessen hinausgeht, was bei der einfachen Gegenwart von Albuminen oder Albumosen vorauszusehen war. Wir fanden ferner einen erhöhten „stalagmometrischen Quotienten" in einzelnen anderen Fällen (abgesehen von Schwangerschaftsurinen in Versuch 9 der Tab. V und in Versuch 4b der Tab. VII). Hier spielten Albumine oder Albumosen keine Rolle. Daraus ergibt sich, daß es fremde Substanzen sein müssen, die zur Erhöhung des „stalagmometrischen Quotienten" führen.

Noch das Weitere zeigen unsere Versuche, daß es wahrscheinlich möglich ist, beginnende bzw. noch nicht abgeklungene Erkrankungen zu erkennen zu einer Zeit, zu der sich klinisch kein

Digitized by Google

Nachweis dafür erbringen läßt (s. Tab. V, Versuch 2). Die fremden Substanzen, die diese Veränderungen des „stalagmometrischen Quotienten" herbeiführen, sind uns noch unbekannt, wir sind augenblicklich mit Untersuchungen in der Richtung beschäftigt, über die wir zu gegebener Zeit berichten zu können hoffen.

Wir übergeben unsere gefundenen Resultate der Öffentlichkeit, weil sie mit einer Methode gewonnen wurden, die auch in wenig geübten Händen diagnostisch verwertbare Resultate ergibt.

Ergebnisse.

1. Es wurden mit dem Traubeschen Stalagmometer normale und pathologische Urine untersucht, nachdem sie der Vergleichsmöglichkeit wegen auf das gleiche spezifische Gewicht von 1010 gebracht waren. Der normale bzw. pathologische Urin (St. 1). wurde einmal in ein Verhältnis gesetzt zu dem gleichen Urin nach Adsorption mit einer 10 proz. Tierkohleaufschwemmung (St. 0).

Das andere Mal wurde der gleiche Urin mit H-Ionen versetzt bis zur Umschlagszone von Methylorange von Gelb in Orange, und Kongorot von Rot in Hellblau (S 1) und auch dieser Urin wieder in ein Verhältnis gesetzt zu dem gleichen mit Tierkohle adsorbierten (S 0).

Wir erhielten so die Verhältniszahlen I. $\frac{\text{St } 1}{\text{St } 0}$ bzw. II. $\frac{\text{S } 1}{\text{S } 0}$ und nannten sie den „stalagmometrischen Quotienten", wobei I. als „Quotient" schlechthin, II. als „Säurequotient" bezeichnet wurde.

2. Bei im üblichen klinischen Sinne normalen Urinen ist der „Quotient" < 100, der „Säurequotient" fast stets < 200, sie schwanken zwischen minimal 19 und maximal 250 in einem Fall.

3. Bei Gallenfarbstoffurinen, bei Nephrosen, Nephritiden, Pyelitiden und Schwangerschaft liegt der „stalagmometrische Quotient" weit höher. Er schwankt zwischen minimal 20 und maximal 465.

4. Es wird gezeigt, daß diese Veränderung nicht allein ihre Ursache im Vorhandensein von Albuminen oder Albumosen haben kann, da Albumine und Albumosen einen „stalagmometrischen Quotienten" von unter 0—187 (s. Tab. XI), die Eiweißurine jedoch von 40—395 haben. Es müssen vielmehr andere

Digitized by Google

uns noch unbekannte Substanzen sein, die bei der Erhöhung eine wichtige Rolle spielen.

5. Unsichere Ergebnisse in bezug auf den „stalagmometrischen Quotienten" zeigt bisher die Eklampsie, die Zahl der untersuchten Fälle beträgt jedoch vorläufig nur 2.

6. Normaler „stalagmometrischer Quotient" zeigt sich vorläufig bei Urämie, Gelenkrheumatismus und Diabetes mellitus.

7. Die klinische Bedeutung der Versuche wird in der Möglichkeit erblickt, aus der Höhe des „stalagmometrischen Quotienten" auf krankhafte Vorgänge bzw. abnorme physiologische Vorgänge im Organismus schließen zu können.

8. Ein Fall (Tab. V, Versuch 9) weist auf die Möglichkeit hin einen Krankheitszustand zu einem Zeitpunkt zu erkennen, zu dem die andern klinischen Untersuchungsmethoden noch versagen.

9. Es wird eine Apparatur angegeben, die die Versuchsanordnung des Traubeschen Stalagmometers sehr erleichtert.

Literatur.

[1]) L. Lichtwitz, Klinische Chemie (Berlin 1918, Verlag von Julius Springer. — [2]) Volhard, Die doppelseitigen hämatogenen Nierenerkrankungen (Berlin 1918, Verlag von Jul. Springer. — [3]) J. Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. 105, 559. Traube-Blumenthal, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 2. — [4]) Bickel, Dtsch. med. Wochenschr. 28. 1905. — [5]) Buglia, Biochem. Zeitschr. 22. 1909. — [6]) Török, Zentralbl. f. Physiol. 20. 1907. — [7]) Ascoli u. Izar, Münch. med. Wochenschr. 1910, Nr. 2, 4, 8, 18, 22, 41. Biochem. Zeitschr. 29. 1910. Berl. klin. Wochenschr. 39. 1911. — [8]) Savaré, Beitr. f. chem. Physiol. u. Pathol. 9. 1907.

Digitized by Google

Über das Vorkommen von Kreatinin und Kreatin im Blute bei Gesunden und Kranken. IV[1]).

Revision der bisherigen Methoden und Ergebnisse. Vergleichende Methodologie.

Von

Joh. Feigl.

(Aus dem Chem. Laborat. des Allgem. Krankenhauses Hamburg-Barmbeck.)

(Eingegangen am 11. März 1920.)

Einführung.

Untersuchungen über Kreatininämie und Kreatinämie haben erst seit 1914 tatsächliche Bedeutung erringen können. Die von Folins handliche Methodik hat alsbald zu umfangreicheren Arbeiten Anlaß und Möglichkeit geboten, die von verschiedenen Seiten, mit zum Teil auch ungleichwertigen Leistungen ausgenutzt wurde. Erst durch die handliche Methodik gelangte man dahin, Anhalte für Normalien und pathologische Verhältnisse zu gewinnen. In dieser Absicht setzten denn auch die maßgebenden Untersuchungen, beschreibend gründlich vorgehend, ein[2]). Leider wurden sie, noch im ersten Stadium dieser Spezialforschung stehend, alsbald von Einflüssen gestört, deren Ausgleich kritischen Aufwand erforderte[3]).

Die Stammethode gelangte zu Modifikationen durch Myers einerseits, durch Gettler andererseits, wobei im ersten Falle

[1]) Die Publikation vorliegender Arbeit verzögerte sich durch Überlastung mit anderen Arbeiten.

[2]) Joh. Feigl, Über Kreatinin und Kreatin im Blute. I, II, III; diese Zeitschr. 81, 74—80. 1917; 84, 264—280. 1917; 87, 1—23. 1918; ebenda ältere Literatur. — Ders., Archiv f. d. ges. experim. Med. 8. 1919; diese Zeitschr. 94, 84—128. 1919. — Ders., Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 83, 3—4, 271—298. 1918; 83, 5—6, 335—367.

[3]) M. Rosenberg, Berl. klin. Wochenschr. 1916, 53, 49, 1314; siehe dazu Joh. Feigl, diese Zeitschr. 81, 28, 43, 65—66, Fußnoten. 1917.

Digitized by Google

unbelanglich höhere, im letzten ganz auffallend niedere Resultate sich ergaben. Schon die erste Abtönung zeigte, wie geringe Abwandlungen der Originaltechnik dazu gehören, um ihre Werte zu verschieben. Ein kritisches Stadium für den analytischen Vorgang brachte die zweite Sonderform mit ihren unverhältnismäßig niederen, von allen übrigen abweichenden Befunden.

Der Großteil der methodenkritisch auf sicherem Untergrunde der damaligen Technik stehenden Beobachtungen — getragen von Folin (mit Denis), Myers (mit Fine und Lough), Feigl — scharte sich so eng, daß damit eine Basis für die erstmalige, exakte Beschreibung der (physiologischen und pathologischen) Kreatininämie und Kreatinämie gewonnen war. Es machte sich derzeit in maßgebender Weise durch Myers, in unbefriedigenden, unkritischen Anläufen von anderer Seite bereits das Bestreben nach diagnostischer und prognostischer Verwertung geltend. Feigl betonte (1916, 1918) im Verfolg vielseitiger Beobachtungen auf pathologischem Gebiete, daß in der Konsolidierung der Methodik an sich wie ihrer beschreibenden Ausbeutung noch viel Aufwand zu betätigen sei, ehe der Reifezustand diagnostisch-prognostischen Fortschreitens Sicherheit beanspruchen könne.

Indirekt von fördernder Wirkung wurde eine durch Mc Crudden und Sargent inaugurierte Polemik[1]), die drum und dran war, die Bestimmungsform selbst an der Wurzel zu gefährden. Ihr Inhalt, die Leitung der Gedankengänge, ihre Ablehnung, an der Folin (mit Doisy), Hunter (mit Campbell), Feigl teilhaben, schließlich das Herausholen fruchtbarer Nutzerträge zugunsten der Methodik, sind von Feigl in mehreren Mitteilungen behandelt worden. Das Hauptmoment wurde eine „reine" Pikrinsäure, ohne die (nach Folins Vorschriften) heute jegliches Arbeiten mit allen quantitativen Pikratreduktionen unwert der Beachtung geworden ist.

In diesem Stadium erschien als wichtigstes Glied der Methodik die Erfassung der relativen farberzeugenden Qualitäten aus Pikrinsäure und Kreatinin einerseits und Pikrinsäure und Alkali andererseits, mithin die Messung ersterer Komponente mit ihrem geringen

[1]) F. A. Mc Crudden u. C. S. Sargent, Journ. of Biol. Chem. 26, 527. 1916.

[2]) O. Folin u. E. A. Doisy, Journ. of Biolog. Chem. 28, 349. 1916/17. — H. Hunter u W. R. Campbell, ebenda

Digitized by Google

Ertrage im Umkreise des Milieus. An dieser Stelle setzt ein Teil der späteren, das Vorgehen läuternden Erwägungen an.

War es die Hauptaufgabe dieser ersten Periode der Erforschung des Kreatinin und Kreatin im Blute, deren normales und krankhaftes Vorkommen beschreibend aus dem Nichts heraus zu begründen und anderen Gebieten an die Seite zu stellen oder unterzuordnen (s. u.), so waren kritische Erwägungen zur Methodik — eine Frucht älterer harnchemischer Erfahrungen auf gleicher Basis — von demselben untrennbar.

Folin, der Schöpfer des reaktiven Prinzips an sich, schuf als Verbesserung früherer Anweisungen den beweglichen Maßstab des Kreatinins (der reagierenden Substanz), gab Anhalte für die zeitliche und graduelle Bemessung der Farbentwicklung (Begrenzung des Alkali, Bemessung des gerinnungshemmenden Oxalates), Myers hatte eine Besserung der Extraktion im Auge, Feigl betrachtete den Bestimmungsvorgang unter dem Gesichtspunkte der Interferenten (s. u.), Gettler gab abweichende Vorschriften für den Vergleichsansatz.

Wilson und Plass gaben vergleichend kritische Beiträge. Gettlers abwegige Technik, die u. a. die von Folin schon genügend gesicherte Einwirkung des Oxalates nicht richtig beurteilte, wurde (1918, s. u.) von Greenwald eingehend kritisiert und abgelehnt. Manche Gesichtspunkte dieses Abschnittes standen unter dem Eindrucke urologischer Erfahrungen, die von Morris eingehend diskutiert wurden (1915).

Die tatsächlichen Kenntnisse des Vorkommens beider Stoffe im Blute wurden von den genannten Forschern, zusammenfassend und weitschichtig[1]) von Feigl gefördert. Die bereits gewonnenen, recht stattlichen Ergebnisse, die, wie gesagt, das Gebiet erst seit der Schaffung der Folinschen Entwürfe 1914 aufzuweisen hatte, mußten sich zunächst vor der durch McCrudden in Fluß geratenen Kritik rechtfertigen. Diese hatte, wie auch Feigls Mitteilungen zeigen, mittelbar segensreiche Folgen, die vorwiegend der Anwendung durch weniger kritische Arbeiter zugute kamen. Hunters, Folins, Feigls methodologische Studien belegten, daß die bisher in sorgsamer Ausführung gewonnenen Zahlen nicht in belanglichem Ausmaße von dem revidierten Standpunkte beeindruckt werden. Die Stufe der speziellen Methodenkritik, welche den genannten Zeitpunkt erfüllt, trug nicht die Folgen in sich, das bisher Geleistete ernsthaft zur Neubearbeitung zu stellen. Das vorhandene Material hat sich bis zu diesem Punkte vollauf

[1]) J. Luc. Morris, Journ. of Biolog. Chem. 22, 201. 1915.

Digitized by Google

rechtfertigen lassen, sofern es unter Einhaltung der maßgebenden Vorschriften gewonnen war.

Immerhin wurde durch Folin in Gestalt einer neuen Modifikation Wesentliches beigetragen. Dem bisherigen Gedankengange angehörend (s. u.), trat die Analyse vor einen der später als entscheidend bewerteten Faktoren. Auch wenn reine, colorimetrisch (relativ, gegen Kreatinin) hochwertige Pikrinsäure benutzt wurde, erwies sich die Beseitigung eines großen, über den reagierenden Betrag hinausgehenden Anteiles als förderlich. Die Methode selbst diente später weiteren Untersuchungen.

Unabhängig von obigen Fragen war schon die Rede davon gewesen, daß u. U. für Kreatinin und Kreatin ungleichwertige Extraktionsverhältnisse (letzteres z. T. komplex gebunden) vorliegen könnten. Die Interferenten der maßgebenden Reaktion wurden von Feigl in pathologischen Blutarten eingehend gewürdigt, Acetonkörper u. U. als störend charakterisiert. Feigl fand auch, daß Brenztraubensäure, Acetol, Dioxyaceton, Glycerinaldehyd, Methylglyoxal schnell reagieren und wies auf die relativ leichtere Mitbeteiligung der Ketosen hin[1]). Er betonte auch, daß (nach Neubergs prinzipieller Feststellung) für das Zucker-Alkaligleichgewicht sich die Gestalt von 3-Kohlenstoffderivaten geltend machen dürfte[2]). Der komplexe Charakter des Reaktionsprinzipes mahnt zu großer technischer und theoretischer Vorsicht.

Der Gang der Analyse, wie er bis zu diesem Zeitpunkte betätigt wurde, ist bekannt. Die Extraktion und Enteiweißung erfolgt durch Pikrinsäure, deren Überschuß in Lösung bleibt (nach Folin und Doisy zu rd. 75% entfernbar ist), selbst reagiert und andererseits das tragende Milieu der Bestimmung bildet[3]). Es erfolgt die Bestimmung von präformiertem Kreatinin im nativen, von Gesamtkreatinin (zur Errechnung von Kreatin führend) im autoklavierten Extrakte[4]). Die Extraktion der beiden Körper ist sichergestellt[5]), aber auch der Übertritt reagierender Interferenten, die z. T. in der zweiten Phase sehr gefördert werden[6]). Diese Frage erfährt eine eigenartige Beleuchtung durch

[1]) Joh. Feigl, diese Zeitschr. 84, 264. 1917; daselbst Literatur.

[2]) Kürzlich von A. Lippmann (Zentralbl. f. inn. Med. 3. 1920) ausgesponnene weite Überschätzung dieser Reaktion ist zurückzuweisen. L. bestreitet die Existenz der Glucose zugunsten von 3—C-Körpern mit nicht zureichendem Beweismaterial.

[3]) O. Folin, Journ. of Biolog. Chem. 17. 1914; 487, daselbst mehrere Arbeiten (mit Denis).

[4]) F. B. Benedict u. V. C. Myers, Journ. of Biolog. Chem. 19, 363. 1914.

[5]) Joh. Feigl, loc. cit. Kreatinin I.

[6]) loc. cit. sowie derselbe, Kreatinin II sowie diese Mitt. (unten).

Digitized by Google

Wilson und Plass[1]). Sie ersetzten die Pikrinsäurevorbehandlung durch Hitzekoagulation und Nachklärung, indem sie im übrigen den Anhydrisierungsprozeß beibehielten (mit $^1/_2$ n-HCl). Ihre Kreatinzahlen sind erheblich niedriger[2]).

Obschon die Beurteilung der Frage nach Verlusten ausstand, stimmt das mit Schlüssen überein, die nach Folin (mit Doisy) und Hunter (mit Campbell) zu ziehen sind und denen im Prinzip auch Greenwald (s. u.) beistimmte. Hier traf man also „Gesamtkreatinin" als fälschlich (in evtl. hohem Grade) gesteigert. Hunter und Campbell gelangten, wie bereits früher beschrieben, zu ihrer „aktuellen" Kurve und schlossen aus der Mitbeteiligung von Interferenten schließlich auf zu hohe Werte für beide Gruppen[3]). Der Hauptsache nach konzentrierten sie sich auf die Auffassung, daß „die Kreatinzahlen etwa die vierfache Höhe der aktuellen Werte erlangen könnten", und dieses cet. par. durch falsche Darstellung der Größe „Gesamtkreatinin".

Kritische Stellungnahme zu den älteren Methoden, neue Analyseverfahren.

Inzwischen erschien nun (1918) eine gründliche kritische Studie von Greenwald und Mac Guire, die außer der Begründung eines durchaus neuen Analysenschemas auch gute methodologische Beobachtungen vermittelt[4]). Bald darauf publizierte Denis (1918) eine abgeartete Form des ursprünglichen Ganges der Analyse[5]). Endlich brachten Folin und Wu (1919) in ihrem System neue Vorschriften[6]). Auch die beiden letztgenannten Arbeiten enthalten kritische Gesichtspunkte. Von besonderem Werte für das vorliegende Gebiet muß — auch wenn die Methodik sich den übrigen neuen praktisch nicht gleichwertig erweisen sollte — die Arbeit Greenwalds sein, die gewissermaßen den umgekehrten Gang der Analyse anstrebt und daher für einen Teil der Fehlermöglichkeiten Anhalt enthalten dürfte.

Durch die neuen Arbeiten, ihre Befunde und den in ihnen enthaltenen Stand der Kritik und vergleichen-

---

1) W. D. Wilson u. E. D. Plass, Journ. of Biolog. Chem. 29, 413. 1917.

2) Siehe bei Greenwald.

3) loc. cit.

4) J. Greenwald u. G. M. Mac Guire, Journ. of Biolog. Chem. 34, 103. 1918.

5) W. Denis, Journ. of Biolog. Chem. 35, 513. 1918.

6) O. Folin u. Hs. Wu, „System der Blutanalyse". Journ. of Biolog. Chem. 38, 81ff. 1919.

Digitized by Google

den Methodologie sind die Fragen der Kreatininämie zugleich mit der der Kreatinämie, besonders des genetischen Zusammenhanges beider, völlig neu aufgerollt. Es handelt sich einmal darum, die neuen Urteile untereinander abzuwägen, da sie zweifellos nicht durchaus dieselbe Fassung zulassen. Vor allem aber ergibt sich die Aufgabe, die neugewonnenen Gesichtspunkte einmal mit den kritischen Äußerungen der Jahre 1916/1917 (Wilson und Plass, Hunter und Campbell u. a) in Verbindung zu bringen und sie ferner an den älteren Standpunkten zu messen. Wichtig ist in dieser Hinsicht eine Äußerung bei Folin und Wu (1919), die die alte Methode, falls es wünschenswert sein würde, als geeignet zur Durchbildung hinstellt.

Praktisch genommen will der Inhalt obiger methodologisch gefaßter Formulierungen folgendes besagen. Die bisher — von Folin, Myers, Feigl u. a. gewonnenen — z. T. mit großem Aufwande erzielten Ergebnisse sind an geeigneten Materialien zu sichten und auf ihre Stichhaltigkeit, ja weiterhin auf ihren Wert oder Unwert zu prüfen[1]). Es handelt sich also darum, ein großes Quantum beschreibender (normaler oder pathologischer Ergebnisse, die als solche durchaus neue Bereicherungen der Chemie des Blutes sind, zu erhärten oder zu streichen, wobei letzteres auf völlige Neubearbeitung der Gebiete hinauslaufen muß, oder sie durch etwaige Interpolationen indirekt zwecks Ausdeutung zu erhalten. Dabei nehmen präformiertes Kreatinin einerseits, Gesamtkreatinin und -kreatin andererseits getrennte Standpunkte ein. Ersteres wird sich im Zweifelsfalle leichter abwickeln lassen. Die Rückwirkungen auf diagnostisch-prognostische Verwertung dürfen dabei schon jetzt mit berücksichtigt werden. Im übrigen aber ist es mit den beschreibenden Daten für die drei Sonderformen des Gebietes allein — so groß die Sache an sich schon ist — nicht erledigt. Bekanntlich sind sowohl das Gebiet der Reduktionsgrößen (d. i. spez. das Blutzuckerproblem durch die Restreduktion) wie auch das System des Nichteiweiß-N weitgehend an den Urteilen interessiert, die über die Ergebnisse im Kreatinin und Kreatin gesprochen werden.

---

[1]) Literatur und Ergebnisse speziell bei Joh Feigl (Kreatinin I); diese Zeitschr. 81, 14. 1917 sowie 94 84. 1919.

Digitized by Google

Beide Fragen sind in erster Linie von Feigl an größeren Materialen[1] [2], in kleinem Ausmaße auch von Myers[3]) in Arbeit genommen worden. Dieser Forscher hat, das RN-Gebiet betreffend, Strukturschemata für einzelne Fälle entworfen, und ersterer hat, jene generell durchbildend, die Kreatinfraktion zur Formulierung des berechneten Aminosäure-N (gegen Bangs summarischen A.-N und in Rücksicht auf den direkt bestimmbaren A.-N) in die Größe (N +) aufgenommen, die sie durch ihre relativ hohen Werte (gegen $\mathrm{U}\overset{+}{\mathrm{r}}\mathrm{N}$ und Kreatinin) weitgehend beeinflußt[4]. In Sachen der Restreduktion liegt mutatis mutandis die Sache ebenso kompliziert. Pathochemische Blutbilder beider Kreise werden naturgemäß weitgehend beeinflußt und daher der Revision bedürftig sein[5].

Gemeinsam ist den genannten drei neuen Arbeiten, die den Anstoß zur Revision der Frage enthalten, im wesentlichen nur eine Manipulation, die sich aber schon bei Wilson und Plass in durchgebildeter Form[6] sowie viel früher bei Rona angedeutet finden läßt[7], nämlich die völlige Scheidung der Bedingungen der Enteiweißung von dem reaktiven Vorgange der Bestimmung des Kreatinins. Die Vereinigung beider Stufen durch Anwendung von Pikrinsäure nach der Folinschen Technik von 1914, beibehalten von Folin und Doisy, enthielt, äußerlich betrachtet, einen großen Vorteil. Indes ist, was namentlich die praktische Anwendung belangt, auch die Trennung der beiden Maßnahmen keine Mehrbelastung gewichtiger Art. Sie ist, wie wir heute sagen müssen, in den Kauf zu nehmen.

In der das Nötige enthaltenden Einzelbesprechung der diffizilen Fragen beginnen wir mit der relativ kompliziertesten Arbeit, zugleich der ältesten in der genannten Serie, der von Greenwald und Mac Guire (1918)[8].

---

[1]) Joh. Feigl, diese Zeitschr. 77, 224. 1916.

[2]) Joh. Feigl, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 83, 5/6 (VII. Mitt.), 335. 1918; ebenda 3/4 (IV. Mitt.), 271ff. — Ders., diese Zeitschr. 84, 1/2. 1919, sowie Ärztl. Verein zu Hamburg 2. V. 1916, ferner diese Zeitschr. 86, 48. 1918 (daselbst ältere Literatur).

[3]) V. C. Myers u. W. G. Lough, Arch. Inter. Med. 16, 536. 1915, daselbst Literatur, sowie 17, 570. 1916 (mit M. S. Fiul). (schematisches RN-Bild für „Nephritis").

[4]) Joh. Feigl, Zeitschr. f. d. ges. experim. Med. 8. 1919.

[5]) Joh. Feigl, diese Zeitschr. 86, 48. 1918.

[6]) D. W. Wilson u. E. D. Plass, Journ. of Biolog. Chem. 29, 413. 1917.

[7]) P. Rona, diese Zeitschr. 27, 348. 1910 sowie loc. cit.[1]).

[8]) J. Greenwald u. G. M. Mac Guire, Journ. of Biolog. Chem. 34, 103. 1918; daselbst Literatur.

Digitized by Google

Die Autoren gehen von der Betrachtung der Folinschen Methode aus. Sie schließen, daß die Auffassung, Kreatinin und Kreatin seien (allein) die in der Farbentwicklung gespiegelten Faktoren, angesichts der Technik wenig überzeugend sei, und wollen darauf hinaus, daß Methoden, die zu niederen Werten disponieren, dabei aber in reinen Lösungen prinzipiell richtig und zur völligen Erfassung der gesuchten Stoffe in Extrakten geeignet sind, der Wirklichkeit um ein beträchtliches näherkommen. Sie bezweifeln mithin glatt den inneren Wert der bisher souveränen Verfahren. Der Myersschen Modifikation werden noch höhere Werte zugesprochen [1]). Die Vorschriften von Gettler und Baker werden in extenso aufgeführt, diskutiert und abgelehnt (Fehler u. a. durch Einfluß des Oxalatzusatzes, unreine Pikrinsäure, anfechtbare empirische Durchrechnung des Biochromatmaßstabes) [2]). Die von Wilson und Plass durchgeführte Technik — übrigens sichtlich ein Anstoß zur Inangriffnahme der methodischen Revision in den drei neuesten Publikationen — führt zwar zu niederen Zahlen; indes bleibt nach Greenwald das von diesen Autoren nicht durchgeprüfte Bedenken bestehen, daß die Isolierung (Heißkoagulation, Nachklärung, Einengen) [3]) zu Verlusten führen könne. Die schon genannten Studien über die colorimetrischen Qualitäten der Pikrinsäure werden zur Grundlage gemacht.

Von großer theoretischer Bedeutung und überdies ungemein instruktiv als Material zur Kenntnis der Gesamtfrage ist folgende, auf die Myerssche Technik bezogene Feststellung. Sie trifft einen der wichtigsten Punkte des Verfahrens, der in der Folin-Doisyschen Arbeit den Kern der Modifikation darstellt. Wird Blut mit Wasser und Pikrinsäure (10,0 ccm + 40,0 ccm + Überschuß über Sättigungsbetrag) gründlich mehrere Minuten geschüttelt, so erhielt Greenwald titrimetrisch (Methylrot) 80% Sättigung des Filtrates an Säure. Leichte Abartung der Technik (z. B. energisches Rühren mit Stäben) führt zu 10proz. Sättigung. Diese — doch sehr weiteren Möglichkeiten offenstehenden — Differenzen (s. u.) tragen (wenn man noch die Voraussetzung colorimetrisch ungleichwertiger Säure miteinbezieht) erhebliche Fehlerbreiten in sich. Greenwald geht im größeren Maßstabe von einem zu 80% Sättigung gebrachten Blutfiltrat aus und bestimmt (relativ angesetzt) für 90%, 70%, 40%, 20% Sättigung die errechneten absoluten Beträge an gefundenem Kreatinin zu bezüglich 2,22 mg, 2,07 mg, 1,85 mg, 1,21 mg (für 100 ccm Blut). Der Fehler liegt dann cet. par. in den verschiedenen Farberträgen bei dem Abfall des Sättigungsgrades in der Stammlösung (100%) zu denen in den Versuchen; die Ursache ist der Farbbeitrag des Pikratmediums, in dem die Reduktion durch Kreatinin zu messen ist.

[1]) V. C. Myers u. M. S. Fine, The Postgraduate 30, 39. 1915; siehe ferner bei Feigl (Kreatinin I).

[2]) A. O. Gettler u. W. Baker, Journ. of Biolog. Chem. 25, 214. 1916. — A. O. Gettler, ebenda 29, 47. 1917. — A. O. Gettler u. R. Oppenheimer, Journ. of Biolog. Chem. 29, 47. 1917.

[3]) S. R. Benedict, später J. C. Bock bildeten die Technik durch, loc. cit.; ferner Journ. of Biolog. Chem. 20. 1915; ebenda 28. 1916/17.

Digitized by Google

Es ist klar, daß Folin und Doisy hier die rein technische Fehlermöglichkeit als Folge verschiedener Untersuchungspraktiken ganz bedeutend senkten. Immerhin trifft der Einwand nur zu, wenn die Vorschriften nicht befolgt wurden. Es ist immer gesagt worden, daß die Technik so streng wie möglich zu nehmen sei und daß man Versuch und Vergleich auf tunlichst gleiche Sättigung mit Pikrinsäure zu bringen habe. Wenn durch mangelnden fachlichen Blick in dieser Hinsicht gesündigt wurde, so trifft der Vorwurf jedenfalls nicht die methodischen Anweisungen Folins und der übrigen ersten Untersucher. Der praktische Wert dieses Greenwaldschen Versuches ist sehr hoch zu veranschlagen und die Ausprobung instruktiv und sehr dankenswert. Wenn man obigem noch etwas hinzusetzen wollte, so wäre es der dringende Hinweis auf die weiten pathochemischen Konstitutionsschwankungen von Vollblut und Säuren in ihrer Einflußnahme auf die weiteren Sättigungsgrade der Filtrate. Erschwert sind obige Fehlerquellen noch dann, wenn die Kreatiningehalte (Versuch, Vergleich) über ein gewisses Maß abweichen. Nach Greenwald reicht der alte Ansatz nicht. Man nehme stets 0,2, 0,4, 0,3, 1,0, 2,0 mg für 100 ccm Flüssigkeit.

Obige Diskussion bringt — abgesehen von allem übrigen (s. u.) — die Kreatininwerte dann zu Falle, wenn genannte Forderungen nicht erfüllt sind. Anders muß das sein, wenn man ihnen gerecht wird. Eine wichtige Aufgabe (s. o.) der Kritik über bestehende Ergebnisse knüpft sich an die Grade: Sättigung zu 100%, zu 90%, zu 80% (und allenfalls zu 70%). Von 90% zu 70% bringt die Arbeit den Abfall von 2,22 mg auf 2,07%.

Die (nach Ablehnung obiger) von Greenwald und Mac Guire entworfenen Methoden zeigen folgende Richtlinien.

I. Gesamtkreatinin. A. Enteiweißung durch die Heißkoagulation. Schnelle Einengung auf das halbe Volumen. Nachklärung a) mit Ferrihydroxydkolloid, b) mit Trichloressigsäure zum Gehalte von 10%. B. Enteiweißung nach der Trichloressigsäuremethode (5% bis 10%, entsprechend verdünnt) nach Greenwald. Für vorliegende Arbeitsmethoden sind ältere und neueste Studien des Autors über RN maßgebend. Letztere Vorschrift — 4,0 ccm Blut in einem Filtratvolumen von 40,0 ccm — wurde theoretisch bevorzugt. Die Methoden leisten völlige Erfassung der gesuchten Fraktion.

II. Analysengang. Es wird Kreatin direkt, Kreatinin durch Rechnung ermittelt. Kreatinin ist durch Kaolin praktisch völlig adsorbierbar, Greenwalds Vorgehen bewegt sich in einer Richtung mit dem von Folin und Denis (1906, Kohlenmethode[1]); direkte Neßlerisation des Harns

[1]) O. Folin u. W. Denis, Direkte Neßlerisation. Journ. of Biolog. Chem. 26, 473—507. 1916; siehe spez. NH_3 im Harn in dieser Zeitschr.: Joh. Feigl, 84, 331. 1917. — Sjöllema u. Hesserky, ebenda. — Spätere Versuche hierzu betr. dem α-Amino-N: N. Okada, Journ. of Biolog. Chem.

Digitized by Google

(U$\overset{+}{r}$N, Ammoniak) verlangt Entfernung des Kreatinins, da es das Reagens reduziert) und dem von J. Bang, der die Kohlemethode zuerst mit des Formoltitration des Amino-N im Harn verband[1]). Diaminosäuren, Kreatinin, Purin, kurz NH_2-haltige und NH-haltige basische Stoffe werden adsorbiert. Greenwald erbringt den Beweis, daß Kreatin nicht adsorbiert wird, Kreatinin dagegen völlig (Folin: mindestens 90%).

Die Technik charakterisiert sich als „direkte“ Kreatinbestimmung. Blut wird in 5 Vol. 0,03 n-Essigsäure eingetragen, gekocht, durch vorsichtiges Nachtropfen von Essigsäure völlig koaguliert, wobei der vorher noch bräunliche Schaum farblos wird und den Umschlag anzeigt. Das klare Filtrat wird gekühlt, der Rückstand heiß nachgewaschen. Feststellung des Volumens, evtl. auffüllen. 5,0 bis 10,0 g reinen Kaolins werden eingetragen und mit der Flüssigkeit sehr gut gemischt. Der früher noch deutliche Schaum ist zart und nicht mehr beständig. Nun kommen nochmals 5,0 bis 10,0 g Kaolin hinzu und für 100 ccm Vol. 1 Tropfen Eisessig. Dieser ballt das Koagulum und erleichtert die Filtration. Ein Volumen Filtrat, das 10,0 ccm bis 40,0 ccm Blut entspricht, wird mit 3,0 ccm $^1/_2$ n-HCl auf 5,0 ccm eingedampft. Bei Menschenblut genügt ein geringeres Filtratquantum. Dann hält man 3 Stunden lang heiß, noch unter dem Siedepunkte (Heizplatte). Nach dem Abkühlen erfolgt die Bestimmung: Neutralisation mit 10% NaOH gegen 1 Tropfen 0,05 proz. Methylrotlösung. 15,00 gesättigte Pikrinsäure, dann 3,0 ccm 10 proz. NaOH. 10 Min. Stehen. Auffüllen zu 100,0 ccm. Filtration (leichte Trübungen kommen vor). Die Standards enthalten die gleichen Ingredienzien.

An ihre Methodik knüpfen die Autoren folgende, das Gesamtproblem weitgehend belangende und seiner Erörterung sehr förderliche Erwägungen und Schlußfolgerungen.

Die Kreatinwerte fallen cet. par. niedriger aus als die durch Autoklavieren erhaltenen. Letztere sind zu hoch. (Es muß an die Methodik von S. R. Benedict erinnert werden; F.) Die Kreatininwerte (berechnet) sind zweifellos nicht absolut genau, aber immerhin „Maximalzahlen“. Die Enteiweißungsmittel bringen Differenzen. Kaolin schlägt u. a. basische Stoffe nieder, die beim Erhitzen mit HCl die Fähigkeit (durch Hydrolyse zur Beteiligung an der Pikratreduktion erlangen. Daher fallen die „direkten“ Zahlen (Folins) zu hoch aus. Ob alle reagierende Substanz Kreatinin ist, steht dahin. Interferenten können nicht sehr bedeutend sein. (30 mg U$\overset{+}{r}$, 100 mg Glucose, 5 mg U$\overset{+}{r}$, der Methodik angepaßt zur Analyse gebracht, ergeben Farbbildung im Betrage von 0,1 mg Kreatinin [2% bis 3% des tatsächlichen].). Kreatinin wird adsorbiert (s. u.). 1,42 mg bis 4,71 mg zu Blut gesetzt, erscheinen mit Fehlern von +0,20 bis —0,02 in angemessenen Versuchen wieder. Kreatin (rd. 2,8 mg zugesetzt zu Blut) erscheint in Filtraten voll wieder.

In Anlehnung an die Kurve von Hunter und Campbell wird ermittelt, daß in 5 bis 10 Min. die Farbmaxima — stabil für 1 Stunde —

[1]) J. Bang, diese Zeitschr 72, 95. 1916.

Digitized by Google

gefaßt werden und daß es sich nicht um eine monomolekulare Reaktion handelt[1]. In Blutfiltraten ist die relative Geschwindigkeit gegenüber reinen Lösungen hoch. Greenwald denkt an ein anderes „Chromogen" oder (in Eisenfiltraten) an katalytische Einflüsse. Nachhinkende Anstiege (später als 10 Min.) können von mitbeteiligter Glucose eingebracht werden. Die Abweichung gegen Hunters Kurven kann darin liegen, daß Greenwald den fraglichen Faktor ausschließt. Greenwald kehrt aber zu der Auffassung zurück (die früher Feigl ähnlich vertreten hat), daß ein Reaktionskomplex in Blutfiltraten sich herausbilden könne, der der Lichtreduktion reiner Lösungen verwandt sei.

Die nach obiger Methode erhaltenen Werte sind unten besprochen.

Die Arbeit von Denis (1918) enthielt folgende Gesichtspunkte[2]:

Der Autor hat eine promptere Methode im Auge; er vermutet von ihr zwar keinen höheren theoretischen Wert als von obiger. Indem er RN und die Kreatinfraktion aus einem Extrakte bestimmt, erweist sich sein Vorgehen als Vorläufer des Folin-Wuschen Systems. Die Enteiweißung mit m-Phosphorsäure nach Folin und Denis ist in dieser Zeitschrift von Feigl und von Sjollema behandelt worden. Sie führt zu Verdünnungen von 1 : 5. Aus 10,0 ccm Blut wird mit je 10,0 ccm Filtrat auf beide Stoffe hingearbeitet. Die Einzelausführung der Bestimmung des präformierten Kreatinins mag in Handbüchern oder in Referaten eingesehen werden. Reifung: 10 Min. Standards (Norm) 0,01 mg und 0,02 mg; (Krankheiten) 0,03, 0,04, 0,05, 0,08, 0,1 mg in 25,0 ccm Volumen. Stammlösungen des Kreatinins in gesättigter (reinster, lichtgeschützter) Pikrinsäure. Abzweigung und Ausgleich des Säuregehaltes in Versuch und Vergleich.

Gesamtkreatinin (im alten Analysengange): Autoklavieren der Phosphorsäureextrakte bei 120° oder (10,0 ccm Filtrat + 72,00 Wasser) 3stündiges Erhitzen auf Heizplatte. Verluste bei Extraktion oder im Reaktionsverlauf stellt Denis in Abrede. Die Methode umgeht nach Denis die den Farbertrag steigernden Interferenzen der Stammethode Folins.

Die nach Denis erhaltenen Werte werden unten besprochen.

Folin und Wu haben (1919) die Bestimmung von Kreatinin und Kreatin im bisherigen Analysengange neu aufgebaut und innerhalb des „Systems der Blutanalyse" auf die Enteiweißung mit Wolframsäure bezogen[3]. Diese ist von Feigl als Problem

[1]) A. Hunter u. W. R. Campbell, Journ. of Biolog. Chem. 32. 195. 1917.

[2]) W. Denis, Journ. of Biolog. Chem. 35, 513. 1918.

[3]) O. Folin u. Hs. Wu, Journ. of Biolog. Chem. 38, 81ff. 1919 (System der Blutanalyse), Enteiweißung S. 82—86; Kreatinin und Kreatin S. 98—100; Tabelle über RN-Bilder S. 109.

Digitized by Google

der Isolierung des Gesamt-RN bearbeitet worden[1]). Die Methodik an sich, auch die Einzelheiten der speziellen Analyse der Kreatinfraktion, sind inzwischen in Referaten und Handbüchern niedergelegt, so daß von ihrer Beschreibung abzusehen sein dürfte[2]). Folin selbst äußert sich über die alte Methodik, „sie habe Kreatin zu hoch wiedergegeben — auf dem Wege über „Gesamtkreatinin". Er sieht eine Hauptquelle in der Bildung von reduktionskräftigem H_2S beim Autoklavieren.

Maßstäblich unterscheidet sich das Vorgehen im „System" Folins von dem bei Denis und bei Greenwald[3]). Folins Wo-Filtrate sind Blutverdünnungen 1 : 10. Präformiertes Kreatinin wird mit 1,0 ccm Blut bestimmt, Gesamtkreatinin mit 0,5 ccm. Die Anhydrisierung erfolgt (also in 5,0 ccm Blutfiltrat) mit 1,0 ccm $^n/_4$-HCl im Autoklaven bei 130° während 20 Min. Erhitzens. Auch das parallel vorgeschriebene Vorgehen für die Harnstoffspaltung — 155°; 10 Min. — ist zulässig und in Hinsicht auf die analytisch-technische Vereinheitlichung angebracht. Die Reaktion wird in beiden Fällen mit alkalischem Pikratgemisch bewirkt, das frisch anzuwenden ist. 25,0 ccm gesättigte Säure + 5,0 ccm 10 proz. NaOH. Für präformiertes Kreatinin nimmt man 10,0 ccm Blutfiltrat (1 : 10 = 1,0 ccm Blut), 5,0 ccm Pikrat emisch und füllt nach Prüfung (8 bis 10 Min.) auf 20,0 ccm auf. Längste Frist 15 Min; gleichzeitig zu bewältigende Ansätze daher höchstens 3 bis 5.

Die Standards sind neu entworfen, rechnerisch vereinfacht und bei etwa kreatininreichen Fällen kann die zur Analyse nötige Blutmenge noch weiter gesenkt werden. Bei den Standards des Gesamtkreatinins wird der Versuch ($^n/_4$-HCl) genau nachgebildet.

Vergleichende Beurteilung der neuen Vorschriften.

Über die nach obigen Methoden von den Autoren erhaltenen Ergebnisse — die dringend der Erweiterung und des Ausgleichs bedürfen — ist folgendes zu sagen:

A. Gesamtkreatinin:

1. Greenwald und Mac Guire: 3,0 mg bis 5,0 mg für 100 ccm normales Menschenblut[4]).

---

[1]) Joh. Feigl, diese Zeitschr. 101, 62. 1919.

[2]) Ref. im Chem. Centralbl. Nr. 2. 1920; Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden (Blutanalyse). Artikel: RN-Gebiet (Feigl) (Aminosäure-N).

[3]) Siehe oben die Detailvorschriften.

[4]) J. Greenwald u. G. Mac Guire, loc. cit. S. 117 sowie Tab. IX u. X, S. 115 u. 116. Die Autoren stellen weiteres Material in Aussicht.

Digitized by Google

2. Denis (soweit dem Material zu entnehmen): 4,0 mg bis 8,0 mg, eng gelagert nur 6,0 mg[1]).
3. Folin und Wu: Mittelwert von 6,0 mg (Norm)[2]). Viele Zahlen zwischen 5,5 mg und 6,0 mg.

Wir haben es in vorliegendem mit großen Abständen zu tun. Sie werden noch verschärft einmal dadurch, daß Greenwald und Mac Guire streng formulieren „alles über 5,0 mg ist schon verdächtig, 6,0 mg sind pathologisch, 10,0 mg kritisch"; d. h. also, die obere Grenze der Norm ist mit 5,0 mg zu ziehen. Denis' Leichtkranke können hier eingesetzt werden; besser jedoch ist die einschlägige Neubearbeitung. Tut man ersteres, so gewinnt man 6,0 mg als Mittel, was sich mit Folin und Wu deckt. Überschüsse über 6,0 mg sind also auch — nach obigem — für die Norm zulässig.

„Gesamtkreatinin" sollte in den drei Techniken ferner der sicherste Punkt sein. Da aber Folin und Wu autoklavieren, Denis dies speziell mit Erhitzen auch tut, Greenwald nach Benedict vorgeht und anders enteiweißt, so ergeben sich hier die Ansätze für ausgleichende und auswählende Kritik von selbst[3]). Naturgemäß müssen die so weit auseinanderstrebenden Urteile im Interesse der Sachlage überprüft werden.

B. Präformiertes Kreatinin:

1. Greenwald und Mac Guire: Verglichen mit den Zahlen nach Folins Technik (in leichter Modifikation gewonnen) sind die Werte durchgehend niedriger, meistens sogar ganz beträchtlich[4]).

---

[1]) W. Denis, loc. cit. S. 515, Tab. I, S. 516.

[2]) loc. cit.

[3]) Siehe die methodischen Einzelvorschriften.

[4]) Die reichhaltigen Tab. IX (allgemeine Patienten) und Tab. X (Morb. Brightii) — loc. cit. — sind vermutlich kaum im ausreichenden Grade zugänglich.

Es seien zitiert aus Tab. IX folgende Zahlen nach Folin (modifiziert Greenwald) bzw. nach Greenwald und Mac Guire: 2,47 : 0,47; 5,24 : 2,43; 6,67 : 0,83; 2,36 : 1,19; 2,20 : 0,85; 1,92 : 0,88; 2,27 : 0,27; aber auch 1,38 : 1,89 und 2,17 : 2,40 und 1,96 : 2,42 und 2,00 : 2,61 neben anderen, auch mehr gegenseitig angenäherten Werten. — Tab. X bietet folgende Zahlen: 5,14 : 2,32; 10,3 : 4,4; 15,0 : 7,3; 24,4 : 11,4; 27,5 : 13,3 neben anderen, z. T. sich nähernden und einigen refraktären, von den Autoren zurückgezogenen Zahlen.

Kreatinzahlen (Tab. IX) 4,33 : 4,69; 7,22 : 2,43; 3,09 : 1,93; 8,96 : 3,00; (Tab. X) 1,6 : 2,6; 10,1 : 9,2 (von den Autoren besonders erwähnt); 3,1 : 3,47; 7,6 : 8,0; 7,3 : 8,8 u. a.

Digitized by Google

2. Denis' Kreatinin fällt nur wenig niedriger aus als nach Folin. 1,3 : 1,0 dürften die größten Abstände darbieten. (Allgemeine Patienten, etwa die entsprechenden Seiten bei Feigl, loc. cit.)
3. Folin und Wu: Ohne Vergleiche gewonnen, pathologisch nicht, dagegen (vgl. Greenwald und Mac Guire) durch RN und U$\overset{+}{r}$N diskutierbare Zahlen. Bei RN (< 34,0 mg) fast ausnahmslos über 1,5 mg; Zahlen darüber hinaus bis zu 2,0 sind auch in streng normalen RN-Bildern vertreten.

C. Kreatin fällt nach dem Gesagten in allen drei Arbeiten stark aus den bisherigen Befunden heraus. Es hängt zudem weitgehend vom Kreatinin (im alten Analysengange ab.
1. Greenwald und Mac Guire: Norm: 1,4 mg bis 3,7. Die älteren Urteile (Feigl, Myers, Rosenberg) über pathologisches Anwachsen bei Nephritis werden bestätigt. Die Vergleiche gegenüber Folin (s. Fußnote).
2. 3. Denis' sowie Folins Zahlen sind wesentlich enger geschlossen, jedenfalls hart an 5,0 mg gelagert, höher als die Greenwalds.

Die Kreatinwerte erscheinen (nach A) in den neuen Methoden relativ niedriger. Gemeinsam ist die Ablehnung aller hohen Zahlen der älteren Reihen. Indes bestehen insofern Differenzen (abgesehen von den nicht direkt vergleichbaren Methoden), als Folin wie auch Denis höhere Zahlen zulassen als Greenwald. Aufs engste mit der kritischen Seite des präformierten Kreatinins (B) zum gesamten Kreatinin (A) verknüpft, erfährt die Summe eine andere Aufteilung. Es läuft also — was die ziemlich einheitlichen Urteile ersterer betrifft — darauf hinaus, „Kreatin direkt" und „Kreatin mittelbar" bestimmt einander zu vergleichen.

Entscheidend ist — nach der Auffassung unserer eigenen Arbeit und als Kriterium zwischen Folin wie Denis einerseits und Greenwald andererseits — die Auswertung der Kreatininfrage. Hier steht letzterer insofern allein, als er selbst seiner Methodik hinsichtlich Kreatinin den schwächsten Punkt zuweist. Die Werte müssen, dem Gange nach, die relativ ungewissesten sein. Sie sind auch weitgehend „unregelmäßig" und sowohl essentiell wie methodisch kaum schematisierbar. Der direkte Vergleich zu Denis drängt sich auf. Beide Autoren lehnen sich

Digitized by Google

an Folins alte Technik an. Indem aber des ersteren Werte hier weitgehend proportional geschlossen durch die immerhin enge Reihe gehen, tun des letzteren Werte das nicht. Hier klafft, wenn man auch Folin und Wu hinzunimmt, die große Lücke. Denis und letztere bringen Zahlen, die man — abgesehen von den absoluten Höhen — in einer Linie diskutieren kann. Sie sind durch Denis' Parallelen und durch Folin und Doisys Vergleiche mit Folins Technik (von 1914) und durch Myers' und Feigls Zahlenreihen zu einem Bilde geformt. Gänzlich abfallend sind Greenwalds Vergleiche.

Greenwalds Arbeit schließt mit dem Bedenken, daß „chromogene Substanz und Kreatinin noch nicht identifiziert seien". Das ist dasselbe, was Feigl früher sagte. Nach ihm hat man sich immer noch auf den Standpunkt zu stellen, daß die Reaktion unspezifisch und komplex ist und die Methode konventionellen Charakter trägt, wenn auch die Nebenerscheinungen nicht einmal genügend beschrieben und zumeist sicher nur etwa 10% der gesamten Reaktion ausmachen (Norm).

Sieht man also nach Denis (1918) wie nach Folin und Wu (1919) für „präformiertes Kreatinin" grundsätzliche Umgestaltungen nicht voraus, so muß zugegeben werden, daß die gemeinsame Betrachtung der drei Arbeiten nur das eine (Kreatin bzw. Gesamtkreatinin) reformiert bzw. reformierbar darstellt, daß aber erhebliche Verwicklungen der Frage neuerdings auftauchten.

Vergleichende und beschreibende Materialien.

Um aus diesen in Rücksicht auf bestehende Ergebnisse herauszukommen, wurden folgende Untersuchungen nötig, die z. T. Lücken in den kritischen Urteilen ausfüllen mußten, weil eben diese nicht schlüssig genug sind.

In den Kreis der Denisschen Reihe sind streng gesichtete Normalfälle in tunlichst vollständigen Analysen einzufügen. Ebenso — und noch dringender — ist der absolute Zahlenbereich — bei Denis mit 1,3 mg präformiertem Kreatinin abschließend — nach oben hin ganz beträchtlich zu strecken. Die Literatur (Myers, Folin, Feigl, Woods) kennt (ältere Technik 1914, 1917) Werte bis zu 30,0 mg hinauf. Ferner sind hierhinein Gesichtspunkte zu tragen, die (RN-Gebiet) die komplexen Verhältnisse zu durchschauen gestatten (s. o.).

Digitized by Google

In die Folin-Wuschen Materialien ist — schon in Rücksicht auf Denis' und Greenwalds Belege — der Vergleich mit der von beiden zugrunde gelegten älteren Technik hineinzutragen. Gerade hier würden die höheren Werte von Interesse sein, wenn in beiden Reihen die Befunde gestreckt würden.

Zieht man nun die Arbeiten von Folin und Wu wie von Denis zusammen, so sieht man (s. o.) auffallende Abstände in den absoluten Werten. Ob sie methodisch oder durch den Charakter der Fälle bedingt sind, ist entsprechend zu prüfen. Das kommt einem direkten Vergleich beider Verfahren zugute, die doch durch den Arbeitsgang aufs engste verknüpft erscheinen, obschon technisch differierend.

Was das „Gesamtkreatinin" betrifft, so müssen die Techniken nach Wilson und Plass, nach Greenwald und Mac Guire, nach Folin und Wu, nach Denis tunlichst auf gleicher Basis verglichen werden; damit ergibt sich die Frage nach den evtl. Einflüssen des Autoklavierens.

Endlich ist die „indirekte" Kreatinbestimmung nach obigem der „direkten" gegenüberzustellen und die Greenwaldsche Vorschrift in toto zu sichten.

Der Standpunkt in Rücksicht auf praktische Durchführbarkeit aus deren Bedingungen ist zu würdigen.

Tab. I gibt (Reihe I) 10 normale Fälle, Gesunde guten Ernährungszustandes, voll untersucht (s. a. Nebenbefunde). Nüchternwerte. Weitere Konstanten dieser Reihen dienen zugleich einer anderen Arbeit[1]).

Hinsichtlich des präformierten Kreatinins: praktisch durchaus Übereinstimmung; Gesamtkreatinin fällt bei Denis stark gegen Folin und Doisy ab (Einzelauflegung s. u.).

Ebendort geben (Reihe II und III) charakterisierte, in typischen Nebenbefunden erläuterte pathologische Fälle. Die Auflösung erübrigt sich. Beziehungen zum „Blutzucker" sind nicht streng faßbar. Kreatinin (präformiert) gibt zureichende Übereinstimmung mit dem alten, dasselbe (gesamt) ebenso einen Abfall wie er sich in Reihe I darbietet. Dieses Absinken ist relativ, wie es scheinen mag, mit dem blutchemischen Komplex in gewissem Grade vereinbar. Die Fälle von Morbus Brightii sind

[1]) Über anorganische Komponenten des Blutes nach neueren Methoden.

Digitized by Google

Tabelle I.

Zur Revision der Analysenmethodik von Kreatinin und Kreatin im Blute.

Vergleichende Bestimmungen nach Denis (1918) und nach Folin-Doisy. Präformiertes bzw. gesamtes Kreatinin in Milligramm für 100,0 ccm Blut. Chemische Nebenbefunde (in Reihenfolge: BZ; RN; UrN; Aminosäure N). Reihe I: Gesunde guten Ernährungszustandes, durchgehend untersucht; Reihe II: Pathologische Fälle A mit Nebenangaben; Reihe III: Fälle von Morb. Brightii, urämische bzw. aminacidämische Azotämien.

Lfd. Nr.	Chemische Nebenwerte	Folin-Doisy Präform. Kreatinin	Folin-Doisy Gesamtes Kreatinin	Denis Präform. Kreatinin	Denis Gesamtes Kreatinin	Ferneres
1	♂ 18	1,5	9,4	1,3	5,8	Blutbilder o. B.
2	♂ 20 Nebenwerte	1,3	9,0	1,2	5,6	Blutfarbstoffe o. B.
3	♂ 22 sämtl. o. B.	0,95	7,6	0,9	5,4	CO_2 — o. B.
4	♂ 27	1,8	10,0	1,6	6,6	Albumin : Glob. o. B.
5	♂ 30 92,0 → 118,0	1,7	9,3	1,6	6,0	—
6	♂ 35 27,0 → 35,0	1,3	8,8	1,1	5,6	Lipämiegebiet o. B.
7	♀ 17 10,0 → 17,0	1,0	6,4	1,1	6,3	—
8	♀ 20 1,3 → 3,5	0,92	7,2	0,85	7,0	NaCl; Ca; K o. B.
9	♀ 27 6,8 → 7,8	0,98	6,0	1,05	4,9	P-Gebiet; o. B.
10	♀ 33	1,4	9,5	1,4	6,4	Wa θ.
1	120,0 / 33,0 / 20,0 / 8,5 / 7,2	1,8	8,4	1,7	6,4	Arth. urica typ.
2	140,0 / 29,0 /	1,7	8,0	1,7	6,2	Arth. rheum.
3	140,0 / 43,0 / 24,0 / 3,6 / 7,9	2,2	10,5	2,0	7,4	Lues I.
4	145,0 / 40,0 / 20,0 / 2,4 / 8,5	2,0	10,0	1,7	7,8	Icterus kat.
5	170,0 / 38,0 / 22,0 / 3,9 / 7,9	1,4	11,0	1,5	6,7	Cirrhose.
6	150,0 / 66,0 / 38,0 / 3,2 / 8,2	2,8	9,5	2,5	7,0	Pneumonie.
7	180,0 / 50,0 / 30,0 / 2,8 / 7,0	2,2	9,6	1,9	7,2	Grippe schwer.
8	350,0 / 29,0 / 14,0 / 2,4 / 7,5	1,4	8,6	1,4	6,6	Diabetes schwer.
9	50,0 / 120,0 / 30,0 / 5,0 / 40,0	6,2	19,6	5,9	17,0	Leberatrophie schwer.
10	25,0 / 90,0 / 20,0 / 4,0 / 35,0	4,4	25,0	4,1	20,0	Leberatrophie schwer.
11	125,0 / 30,0 / 15,0 / 6,2 / 5,2	0,95	8,4	1,0	6,6	Leukämie.
12	130,0 / 32,0 / 16,0 / 2,5 / 4,0	1,22	7,2	1,1	5,8	Pern. Anämie.
13	140,0 / 45,0 / 22,0 / 3,0 / 6,0	1,0	6,8	1,0	5,6	Ca uteri.
14	125,0 / 33,0 / 20,0 / 2,8 / 6,2	0,92	5,9	1,0	5,3	Basedow.
15	145,0 / 50,0 / 30,0 / 4,0 / 6,5	1,45	7,8	1,2	6,2	Furunkulose.
1	120,0 / 330,0 / 270,0 / 3,0 / —	30,2	38,5	26,0	32,0	Morb. Brightii
2	110,0 / 270,0 / 240,0 / 4,0 / —	22,0	29,8	18,0	24,5	„urämische“
3	100,0 / 220,0 / 180,0 / 5,2 / —	10,5	18,5	10,0	17,0	RN-Bilder.
4	130,0 / 200,0 / 175,0 / 2,5 / —	14,7	20,5	14,2	20,0	
5	95,0 / 172,0 / 152,0 / 3,0 / —	7,8	19,0	8,0	15,2	
6	140,0 / 250,0 / 170,0 / 7,0 / —	15,2	30,0	14,0	25,2	Morb. Brightii
7	125,0 / 220,0 / 148,0 / 9,2 / —	7,5	20,5	6,0	16,2	„aminacidämische“
8	95,0 / 180,0 / 120,0 / 6,5 / —	10,0	30,2	9,2	26,0	RN-Bilder.
9	100,0 / 150,0 / 100,0 / 7,0 / —	20,0	38,0	18,0	23,0	

Digitized by Google

pathologisch nicht näher, sondern nur pathochemisch, nach RN-Strukturen (s. dort) definiert. Es finden sich hohe Werte. Proportional nimmt der Abfall des Kreatins bei Denis nicht zu. Das kann zu Schlüssen im Greenwaldschen Sinne verleiten.

Tabelle II.

Zur Revision der Analysenmethode von Kreatinin und Kreatin im Blute.

Vergleichende Bestimmungen nach Folin-Doisy, Denis, Folin-Wu. Präformiertes bzw. gesamtes Kreatinin in Milligramm für 100 ccm Blut.

Nr.	Folin-Doisy		Denis		Folin-Wu	
	Präform. Kreatinin	Gesamtes Kreatinin	Präform. Kreatinin	Gesamtes Kreatinin	Präform. Kreatinin	Gesamtes Kreatinin
Tab. 1. Gruppe I. Normal. 1	1,5	9,4	1,3	5,8	1,4	6,2
2	1,3	9,0	1,2	5,6	1,3	5,8
3	0,95	7,6	0,9	5,4	1,0	5,6
4	1,8	10,0	1,6	6,6	1,6	6,8
5	1,7	9,3	1,6	6,0	1,7	6,2
6	1,3	8,3	1,1	5,6	1,2	5,8
7	1,0	6,4	1,1	6,3	1,2	6,6
8	0,92	7,2	0,85	7,0	1,0	7,3
9	0,98	6,9	1,05	4,9	1,0	5,3
10	1,4	8,5	1,4	6,4	1,5	6,6
Tab. 1. Gruppe II. 3	2,2	10,5	2,0	7,4	2,2	7,5
5	1,4	11,0	1,5	6,7	1,4	7,4
6	2,8	9,5	2,5	7,0	2,8	7,3
8	1,4	8,6	1,4	6,6	1,4	7,0
9	6,2	19,6	5,9	17,0	6,2	18,0
10	4,4	25,0	4,1	20,0	4,2	20,2
13	1,0	6,8	1,0	5,6	0,98	5,8
Tab. 1. Gruppe III. 1	30,2	33,5	26,0	32,0	26,4	32,5
3	10,5	18,5	10,0	17,0	10,2	17,3
5	7,8	19,0	8,0	15,2	7,9	16,0
6	15,2	30,0	14,0	25,2	14,3	26,0
8	10,0	30,2	9,2	26,0	9,4	26,4

Tab. II bringt Material aus Tab. I (Aderlaßblute), durchgeführte Vergleiche zwischen Denis (1918), Folin-Wu (1914), Folin-Doisy (1917). Präformiertes Kreatinin ist bei Folin-Wu ein wenig höher als bei Denis, praktisch in den drei Methoden genügend übereinstimmend dargestellt. Gesamt-Kreatinin geht oben gegebenen Verhältnissen nach, bei Folin-Wu etwas höher als bei Denis.

Die Technik folgte hier genau den Originalvorschriften (nur Autoklavenspaltung).

Digitized by Google

Nach den Tab. I und II ist im Beihalt zu Denis und Folins und Wus Zahlen ein Zweifel daran nicht mehr möglich, daß die revidierten Methoden des alten Analysenganges — Gesamt-Kreatinin, präformiertes Kreatinin direkt, Kreatin durch Differenz — für das präformierte Kreatinin Befunde ermitteln, die sich von den bisher vorliegenden, streng nach den Originalvorschriften gewonnenen, praktisch nicht so weit entfernen, daß die Materialien gefährdet sind. Meines Erachtens sind sie — immer unter dem Eindruck der Auffassung, daß die Methode konventionellen, unspezifischen Charakters mit überwiegender Betonung des Kreatinins ist — durch obige Belege erhärtet und bestätigt. Dabei darf schon gesagt werden, daß cet. par. der klinisch durchgeprobte oder noch zu erhärtende diagnostische Wert des präformierten Kreatinins seine Bedeutung, auf obige analytische Basis gestellt, beibehält (s. a. u.). Wieweit mit „gesamtem Kreatinin" darin Erfolge zu erzielen sind, ist unabhängig zu prüfen (s. u.). Die alten Werte für „Gesamt-Kreatinin" und für Kreatin sind zu streichen und in paralleler Ausführung neu zu schaffen.

Die Gewinnung und Verwertung der Zahlen für „präformiertes Kreatinin" auf der Greenwaldschen Grundlage erfordert ein Ausholen auf die Hauptetappen des dortigen Ganges. Damit gelangen wir zunächst zur Revision der das „Gesamt-Kreatinin" belangenden Vorschriften. Autoklavieren und direktes Erhitzen (Benedict) sind zu scheiden[1]).

Zur Tab. III ist zu bemerken, daß die angezogenen Fälle sinngemäß aus Tab. I übertragen sind. Unter 1 steht jeweils die nach Vorschrift ausgeführte Autoklavenmethode, unter 2 die nach Greenwald-Benedict bewirkte Anhydrisierung unter Erhitzen. Die Bezeichnung 1+ bedeutet, daß die hier stehenden Werte die direkten Befunde (nach den Autoren) der Tab. I sind; 2 enthält demnach die technischen Abwandlungen. Unter Greenwald-Mac Guire bedeutet A die direkte Trichloressigsäuremethode, die also am weitesten den Denis-Folin-Wuschen Zahlen sich anähneln müßte. B ist die Hitzekoagulation + $Fe(OH)_3$-Nachbehandlung, C dieselbe mit Trichloressigsäure.

---

[1]) S. R. Benedict, Journ. of Biolog. Chem. **18**, 191. 1914. — L. Baumann u. Th. Ingwaldsen, ebenda **25**, 195. 1916.

Digitized by Google

Tabelle III.

Zur Revision der Analysenmethodik von Kreatinin und Kreatin im Blute.

Vergleichende Bestimmung des „Gesamtkreatinins“ I, mg Gesamtkreatinin für 100 ccm Blut.

	Nr.	Denis		Folin-Wu		Greenwald-Mac Guire					
						A		B		C	
		1 +	2	1 +	2	1	2	1	2	1	2
Aus Tab. I Reihe I	4	6,6	6,5	6,8	6,5	6,6	6,2	6,0	6,0	6,0	6,0
	8	7,0	6,8	7,3	7,0	7,0	6,7	6,3	6,0	6,5	6,4
	10	6,4	6,4	6,6	6,5	6,0	6,0	6,2	6,2	6,3	6,3
Aus Tab. I Reihe II	3	7,4	7,0	7,5	7,1	7,3	7,0	7,0	6,7	7,0	6,8
	6	7,0	6,7	7,3	6,7	7,0	5,6	6,9	6,5	7,1	6,6
	8	6,6	6,0	7,0	6,2	6,8	6,2	6,0	6,0	6,3	6,1
	10	20,0	17,5	20,2	17,0	18,0	16,2	18,8	16,0	19,2	16,2
	12	5,6	5,2	5,8	5,2	5,7	5,1	5,2	5,0	5,6	5,0
Aus Tab. I Reihe III	1	32,0	30,0	32,5	25,5	32,0	29,8	31,9	29,0	33,0	29,2
	5	15,2	14,3	16,0	14,5	16,2	14,2	15,6	14,0	15,8	14,0
	6	25,2	24,0	26,0	23,0	25,5	25,0	24,2	23,0	25,0	23,8
	8	26,0	22,0	26,4	23,0	27,2	22,5	26,0	20,0	26,3	22,0

Es ist nachzutragen, daß die direkte Trichloressigsäuremethode, im Gange von Folin-Doisy bzw. von Denis bzw. von Folin-Wu ausgeführt, verglichen mit diesen hinsichtlich des „präformierten Kreatinins“, hierbei Werte gibt, die denen von Denis, damit den älteren Folinschen und dieses Autors neueren Zahlen nahestehen, praktisch identisch ausfällt. Auch für die abgewandelten Techniken B und C trifft — wenn sie in den Gang Folins eingesetzt werden — das zu. Zur Ausschaltung weiterer, naturgemäß auf eine Basis zu prüfender Abweichungen wurden die Enteiweißungstechniken genau nach den Vorschriften gemacht, die übrigen Stufen jedoch auf einen einheitlichen Standpunkt — maßstäblich und reaktiv —, den am weitesten vorgeschrittenen nach Folin und Wu versetzt.

Aus den Ergebnissen der Tabelle ist zu entnehmen einmal, daß unter gewissen pathologischen Komplikationen die Autoklaventechnik höhere Werte gibt als das bloße Erhitzen. Die chemischen Blutbilder weisen hier auf Stoffe hin, die den Zuständen eigentümlich sind und die wir noch zu beurteilen haben. Die Erscheinung selbst geht durch die ganze Reihe der Enteiweißungen — fallweise ziemlich parallel. Sie ist relativ

Digitized by Google

gering zu veranschlagen in normalen Blutarten, so daß hier, soweit Belegmaterial vorliegt, die Wahl des Anhydrisierungsvorganges offen bleiben kann. Die in der Tabelle ersichtlichen komplizierteren Fälle zwingen dagegen zur Erkenntnis, daß man sich nach weiteren Anhalten für die Auswahl des anhydrisierenden Faktors umsehen muß (s. u.).

Technisch genommen scheint es, als ob — besonders in den komplizierten Fällen — die Trichloressigsäure dem Autoklavenvorgang ungleichmäßiger unterworfen sei als die anderen Methoden. Das ist jedoch theoretisch anscheinend — praktisch sicher — von nebensächlicher Bedeutung, da der Entwurf solches nicht vorsieht. Unter den Methoden Greenwalds fällt für die Hitzekoagulationen in Kombination, besonders mit $Fe(OH)_3$, auf, daß die Zahlen durchgehend niedriger ausfallen als bei der direkten Enteiweißung — jedenfalls sind hier Abstände vorhanden, zu deren Erklärung noch weitere pathologische Materialien heranzuziehen sind. Es kann einmal angenommen werden, daß Kreatin in geringem Maße bereits anhydrisiert wird, daß die relativ lange Dauer Umsetzungen einleitet, ferner aber ist nicht von der Hand zu weisen, daß u. U. komplex-gebundenes Kreatin (oder reaktive Interferenten) durch Hydrolyse abgespalten, zum freien hinzutrete. Im Einklang mit Greenwalds ausgedehnten Studien wird man — unabhängig von dem Zugeständnis, daß die Bestimmungsform (zweite Stufe) und der Maßstab Einflüsse äußern — darauf hingewiesen, die Enteiweißungsmittel als lenkende Faktoren für die den Farbertrag mehrenden Interferenzen anzusehen. Das führt weiter zur Prüfung der „direkten“ Kreatinbestimmung und ist offenbar nur an Hand dieser zu klären. Versuche, nach Greenwald die Enteiweißung so zu lenken, daß sie „läuternd“ wirke, wurden mit P. W. S. unter weitgehend komplizierter Technik gemacht (Entfernung des Überschusses). Sie lehren, daß dann der Betrag für präformiertes Kreatinin gegenüber den mit einfachen Mitteln (m-Phosphorsäure — Wolframsäure — Trichloressigsäure — $Fe(OH)_3$ [$Al(OH)_3$-Nachbehandlung] erhaltenen weiter sinkt. Doch trifft dies nicht für alle Kombinationen, etwa proportional geordnet, zu.

In Tab. IV sind Versuche zusammengestellt, die von der „direkten“ Kreatinbestimmung im Sinne von Greenwald und Mac Guire ausgehen. Sie sind durchweg in höheren Maßstäben

Digitized by Google

Tabelle IV.

Zur Revision der Analysenmethodik von Kreatinin und Kreatin im Blute.

Vergleichende Bestimmung des Kreatins mit Rücksicht auf die „direkten" Befunde an Material zur Aufklärung der Abweichungen gegenüber den „berechneten" Werten. mg Kreatin in 100 ccm Blut.

Gruppen (Fälle)	Laufende Nr.	Direkt. Kreatin-bestimmung d. Greenwald-Mc Guire	Kreatin im Sinne von Folin als Differenz (ohne Autoklavieren bestimmt): Methode Denis	Methode Folin-Wu	Methoden von Greenwald-Mc Guire: A	B	C
Normales Blut	1	3,2	4,0	4,2	3,9	3,7	4,0
	2	4,7	5,2	5,4	5,1	4,9	5,0
	3	4,3	5,0	5,3	4,9	4,8	4,7
	4	3,8	4,3	4,6	4,2	4,0	3,9
Hoher BZ Diabetes	1	5,8	6,5	6,6	6,5	6,2	6,4
	2	4,3	5,2	5,4	5,3	5,0	5,3
	3	5,4	6,0	6,1	6,0	5,7	5,9
Urämische Fälle mit hohem U+N im RN	1	8,7	9,2	9,3	9,2	9,0	9,2
	2	6,2	7,5	7,3	7,3	7,1	7,3
	3	4,4	5,6	5,5	5,5	5,2	5,4
Aminacidämische Fälle mit hohem RN	1	7,9	10,2	10,0	10,0	9,8	—
	2	10,2	11,2	11,2	—	10,7	11,1
	3	11,2	14,6	14,3	14,7	14,0	—
Schwere kachektische Fälle	1	4,3	6,2	6,0	6,1	5,7	—
	2	5,2	7,2	7,4	7,3	6,8	7,2
	3	6,6	9,0	9,1	8,9	8,2	—
Bil.-Fälle: Hämolyt. Bil.	1	2,9	5,0	5,1	5,0	4,7	5,0
	2	4,1	6,0	5,8	—	4,2	5,5
Bil.-Fälle: Hepat. Bil.	1	2,4	4,2	4,1	4,2	3,7	—
	2	5,2	5,4	5,5	5,5	5,2	—

ausgeführt als die analytischen, z. T. auf 50,0 ccm bis 100,0 ccm Blut gegründet worden. Die Untergruppen der Vergleichsmethoden sind orientiert wie Tab. III (Greenwald A, B, C). Die Versuche zielen nur auf methodische, nicht auf beschreibende Verhältnisse. Das Material ist, soweit angängig, nach klinischen und pathochemischen Gesichtspunkten typisiert, um Extreme für die bezeichneten Gruppen zu erzielen. Die relative farbmindernde Wirkung des Kaolinverfahrens im Vergleich zu den übrigen Methoden wird hingelenkt der Hauptsache nach 1. auf höhere aminacidämische RN-Fälle, 2. auf Blutzusammensetzung bei ausgesprochenen und schweren Kachexien, 3. auf Bilirubinämie des

Digitized by Google

anhepatischen Typus. Glykosurische Fälle ohne erheblich komplizierte Blutbilder scheinen relativ wenig Einfluß auszuüben, doch ist das Verhalten schwankend. Direkt in Vergleich sind die beiden Prinzipien nicht zu bringen, da für die „Differenzrechnung" immer noch die Anhydrisierung im Spiele ist. Die Einflüsse, welche — bei Ausfall der Adsorptionsbehandlung — „Kreatin" künstlich erhöhen, müssen also in adsorbierbaren Stoffen bestehen. Es ist durch Bang und durch Folin und Denis (in den Studien letzterer zur „direkten Neßlerisation") bekannt, daß geeignete Adsorbentien die basischen Aminosäuren neben Kreatinin erfassen. Ebenso verhalten sich Proteinsäuren und Grenzgebilde des RN-Gebietes, sowie Komplexe niederen Grades aus Purinen usw. Man darf annehmen, daß gerade diese es sind, die bei der Hydrolyse in Stoffe übergehen, die in bezug auf die Farbreaktion des Kreatinins „chromogenen Charakter" haben. Zweifellos sind die einschlägigen Vorgänge sehr verwickelter Natur. Es fragt sich nun, ob man durch Fällung oder Adsorption in modifizierten RN-Techniken Kreatinin und Kreatin von diesen befreien kann. Bisher ist es nicht gelungen, ersteres von letzterem zu scheiden. Im Prinzip hat also die direkte Bestimmung des Kreatins eine hervorragende Bedeutung. Nun fallen aber, wie die Tabelle zeigt, schon in der Norm die einschlägigen Werte gegen die mittelbar erhaltenen ab. Man erhält im Mittel 85%, oft noch weniger, selten mehr als auf letzterem Wege. Dieser Betrag ist unkonstant und hängt von der chemischen Natur des Blutes ab.

Es beträgt z. B. der nach Greenwald und Mac Guire dargestellte Betrag von den Werten der höhere Befunde liefernden Reihen bei den normalen Fällen rd. 85%, d. h. absolut ist der Abstand 0,8 mg für 100,0 ccm Blut oder rd. 15% von den jeweils höheren Zahlen. In der größeren Reihe ist der Abstand mit 15% bis 10% Fehlbetrag gegen Denis u. a. gegeben. Bei den hyperglykämischen Fällen lauten die Zahlen entsprechend 87,5% bzw. 0,7 mg bzw. rd. 12%; bei den harnstoffreichen (typisch „urämischen") Azotämien (akute Glomerulonephritis) entsprechend rd. 86% bzw. 1,0 mg bzw. rd. 14%; bei den an Harnstoff relativ armen, aminacidämischen nephritischen RN-Bildern entsprechend rd. 81% bzw. 2,2 mg bzw. rd. 18%; bei den schwer kachektischen Fällen (besonders Ca u. a.) entsprechend rd. 72% bzw. 2,1 mg und bzw. 28%; bei den hämolytischen,

Digitized by Google

anhepatischen Bilirubinämien entsprechend rd. 64% bzw. 4,0 mg und bzw. 36%; bei den hepatischen Bilirubinämien entsprechend rd. 80% bzw. 2,0 mg oder 20%.

Weitere Zahlen, die nicht mit aufgenommen sind, liegen in der gleichen Richtung. Aminacidämische und kachektische Bilder erheben sich zumeist auf 33% Abweichung, die also cet. par. bei Denis usw., in den direkten Methoden, als künstlich erhöhter Betrag erscheinen. Fälle, in denen beides zusammentrifft, steigen noch darüber hinaus.

Man wird nach Obigem dazu geführt, im wesentlichen an folgende Typen blutpathochemischer Art zu denken: 1. an Farbstoffe und Chromogene (reagierend die letzteren), besonders der reduktiv kräftigen Individuen; 2. an Aminosäuren, die in höheren RN-Bildern vorkommen. Es darf an Diaminosäuren, aromatische Typen u. a. besonders gedacht werden, da diese u. a. sekundär umgesetzt werden könnten; 3. an höhere Gebilde aus Aminosäuren (vgl. 2) oder an deren Trümmer; 4. an besondere Typen N-haltiger Stoffe, die proteinähnliche Konstitution haben. Man darf an Individuen oder reagierende Komplexe des theoretischen oder methodischen, analytischen Gesamtbegriffes der Oxyproteinsäuren denken; 5. an Grenzvorkommnisse primärer und sekundärer Art der Kohlenhydratreihe (C 3 Stoffe, Glucuronsäure, Umlagerungen); 6. an Stoffe des Gesamtbegriffes der Phenole[1]) (vgl. z. B. 1).

Man wird diese Stoffe in Kombinationen zu prüfen haben, wie es Greenwald schematisch für RN und BZ tat. Nahezu allen ist bei den neuesten Methoden (Ausnahme wohl Greenwald — B [s. o.]) der Übertritt in die Extrakte freigestellt, während Kaolin sie meistens adsorbiert.

Nun bestimmt Greenwald Gesamt-Kreatinin in Methoden, deren Werte, wie gesagt modifiziert, sich denen nach Denis und nach Folin und Wu anähneln lassen und die größere Differenzen dann nicht ergeben. Unmittelbar nach Greenwald ausgeführt, fallen die Zahlen niedriger als nach Denis usw. aus. Wir stießen trotzdem in größeren Reihen auf höhere Zahlen, als Greenwald (s. o.) sie fand. Gesamt-Kreatinin nach Greenwald und Mac Guire bleibt um 15% bis 10% hinter dem nach Folin-Wu

[1]) Vgl. die Studien von S. R. Benedict u. R. C. Theys, Journ. of Biolog. Chem. 33. 1918.

Digitized by Google

bzw. Denis bestimmten zurück (25 Normalzahlen). Wir fanden in eben diesen Versuchen aber auch „Kreatin" nach der direkten Methode etwas höher, bis zu einem Mittel von fast 5,0 mg sich erhebend. Vorgebildetes Kreatinin fällt aber trotzdem in einheitlichen Fällen — obzwar in Summa etwas niedriger als bei Denis — nicht soweit auseinander, wie Greenwalds Krankenmaterial angibt. Auch wir fanden hier größere Unregelmäßigkeiten, was methodisch nicht wundernimmt.

Hierüber orientiert

Tabelle V.

Zur Revision der Analysenmethodik von Kreatinin und Kreatin im Blute.

Vergleichende Bestimmungen — als gesamtes, als präformiertes Kreatinin — nach den neuen Methoden. Gewonnen an 35 gutgenährten, kräftigen, gesunden Männern von 20—35 Jahren. mg Substanz für 100 ccm Blut bzw. Prozentzahlen.

	Folin-Wu	Denis	Greenwald-Mc Guire
	Gesamtkreatinin		
Extreme	4,7 → 7,0	4,6 → 6,8	3,9 → 6,0
Mittelwert	6,0	5,8	5,0
Mittelbereich			
a) absolut	5,4 → 6,3	5,1 → 6,1	4,3 → 5,1
b) proz. i. d. Gegenreihe	80,0	85,0	77,0
	Präformiertes Kreatinin		
Extreme	1,0 – 2,0	0,85 → 1,9	0,51 → 2,21
Mittelwert	1,55	1,5	1,1
Mittelbereich			
a) absolut	1,3 – 1,7	1,2 – 1,55	0,75 → 1,5
b) relativ	82	76	50

Es sind 25 allerseitig beobachtete gesunde, wohlernährte Männer von 20—35 Jahren vergleichend auf RN und Kreatinin untersucht worden. Nüchternentnahmen. Das Tatsächliche mag der Tabelle entnommen werden. Angeschlossen an die Tab. I—II wird man erneut ersehen, daß präformiertes Kreatinin im Prinzip durchaus mit den sorgfältig gewonnenen alten Werten auf einer Höhe steht. Selbst bei Greenwald und Mac Guire wird die absolute obere Grenze nicht eingeflochten, wennschon der rechnerische Mittelwert (der 25 Fälle) niedriger fällt. Das Ausein-

Digitized by Google

anderstreben der Werte ist hier ersichtlich besonders im Gegensatze zu den Nebenstaffeln der Tabelle.

Es ist nun zu fragen, wie sich diese Werte deuten lassen. Die relative Inkonstanz ist methodisch und rechnerisch erklärlich. Die Frage spitzt sich darauf zu, wieweit die gedachten Interferenten schon bei der direkten Bestimmung des präformierten Kreatinins wirksam werden. Diese sind von den „Kreatin"-zahlen ausgegangen, nicht aber im vollen Umfange aus den Zahlen für „Gesamt-Kreatinin", bei dem die $Fe(OH)_3$-Nachbehandlung dem Ziele am nächsten kommt und tatsächlich Chromogene, Purine, höhere Aminosäuren, Oxyproteinläger u. a. weitgehend beseitigt. Richtig ist der jetzt definierte Ausspruch von Greenwald und Mac Guire, den allerdings Feigl schon früher — ohne das Hauptargument heutiger Versuche — tat: „Den niederen Werten in der Beurteilung der Vorrang einzuräumen". Es zeigte sich, daß mit ansteigendem präformiertem Kreatinin, besonders bei akuter Nephritis, der Abstand zwischen Greenwald einerseits, Folins Techniken, Denis sich relativ weitgehend minderte. Das war in komplizierteren pathochemischen Blutarten nicht der Fall, besonders auch bei mäßigen und hohen Kreatininzahlen in „chronischer" Nephritis (Sklerose). Es kommt also auch für freies Kreatinin offenbar derselbe Kreis von Interferenten in Frage, wie die „indirekte" Autoklavenmethode des Kreatins. Wir haben uns überzeugt, daß in solchen Bildern, deren Werte nach Folins alter Technik am weitesten abweichen, bis zu 100% Mehrertrag resultieren kann.

Es scheint also, daß man „Kreatin" in diffizilen Fällen selbständig bestimmen sollte. Die Vorteile sind groß genug, um bei wichtigeren Anlässen die doppelte Arbeit der beiden „direkten" Bestimmungen zu rechtfertigen. Verf. hat besprochen und z. T. angedeutet, in welcher Richtung weitere Versuche — nunmehr rein methodischer Art — die Interferenzen betreffend, den vorliegenden Aufgaben die dringend notwendige, fernere Aufklärung bringen können. Über diese soll demnächst berichtet werden.

Schlußsätze.

In der vorliegenden (IV.) Mitteilung über Kreatininämie und Kreatinämie wird zu den Ergebnissen der revidierten Methodik Stellung genommen.

Digitized by Google

Es werden sachliche, kritische und beschreibende Angaben gemacht.

Das Hauptargument des durch die Revision geschaffenen Standpunktes der Gesamtfrage ist darin zu erblicken, daß die in einwandfreier Weise nach der älteren Folinschen Technik gewonnenen Ergebnisse über präformiertes Kreatinin ihre Bedeutung praktisch durchaus zureichend beibehalten. Die Zahlen für Kreatin sind — aus allen Ergebnissen amerikanischer und deutscher Forscher — zurückzuziehen Ihre beschreibend physiologische bzw. pathologische Benutzung ist zwecklos. Der Ersatz ist durch die neuen Methoden zu schaffen.

Es wird über neue Ergebnisse an Gesunden berichtet, desgleichen an weitgehend variiertem Krankenmaterial.

Die neuen Methoden werden technisch und theoretisch an Hand von Belegmaterialien beurteilt. Vergleichsuntersuchungen zwischen diesen und den alten Vorschriften werden über größere Bereiche der Blutpathologie geführt.

Präformiertes Kreatinin wird, wie bisher schon bekannt, als die variablere Größe in Krankheitszuständen, besonders azotämischer Art, angesehen. Kreatin zeigt, abgesehen von Sonderfällen, nicht so sehr die Neigung zum Ansteigen. Ob mit „Gesamt-Kreatinin" generell diagnostische Schlüsse am Platze sind, ist zu bezweifeln. In engerem Kreise scheint dies möglich zu sein. Die zuverlässigste Bestimmung von „Kreatin" ist mit der „direkten" Methode gegeben. Methodologische Versuche, die zu diesem Urteile führten und die anderen Formulierungen mit bedenken, sehen sich darauf verwiesen, die möglichen Interferenzen systematisch durchzuprobieren in Ansätzen, die den eiweißfreien Filtraten möglichst nahekommen. Art und Umfang der Interferenzen sind z. T. Folgeerscheinungen der enteiweißenden Maßnahmen. Aus pathologischen Materialien läßt sich auf die Typen interferierender Stoffe, Gruppen und Komplexe schließen. Diese bilden den Gegenstand der demnächst abzuschließenden Versuche.

Die mittelbaren Wirkungen der revidierten Ergebnisse sind auf das Gebiet des Blutzuckers (Restreduktionsproblem) und des Nichteiweißstickstoffes (Aminosäurefraktion) verlegt und dort noch zu beurteilen.

Eine weitere Mitteilung wird sich mit den genannten und ferneren wichtigen Fragen des Arbeitsgebietes beschäftigen.

Digitized by Google

Eine Methode zur graphischen Darstellung chemischer Verbindungen und Reaktionen.

Von

Otto Liesche.

(Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Chemie, Berlin-Dahlem; Laboratorium Direktor E. Beckmann.)

(Eingegangen am 20. März 1920.)

Mit 12 Abbildungen im Text.

1. Die Aufgabe der Biochemie besteht darin, die Stoffe, aus denen der Organismus sich aufbaut, als chemische Individuen zu erkennen, sowie die chemischen Reaktionen aufzuklären, mittels deren sich der Aufbau und Abbau der Stoffe, d. h. der Stoffwechsel im Organismus vollzieht.

Die erste notwendige Bedingung für die Festsetzung eines bestimmten chemischen Individuums und die Erkennung einer bestimmten chemischen Reaktion ist dadurch gegeben, daß die Daten der experimentellen Forschung mit den quantitativen Grundgesetzen der Chemie, dem Gesetz der konstanten und dem Gesetz der multiplen Proportionen in hinreichender Übereinstimmung stehen müssen.

Diese grundlegenden Verbindungsgesetze, die nicht allein für den Zusammentritt von Elementen zu Verbindungen, sondern ganz allgemein für chemische Reaktionen zwischen verschiedenen Stoffen gelten, beherrschen das gesamte chemische Geschehen und somit auch unser ganzes chemisches Denken.

Trotz der Einfachheit der verstandesmäßigen und rechnerischen Handhabung bringen die chemischen Verbindungsgesetze daher eine außerordentlich große Mannigfaltigkeit verschiedener Kombinationen und Komplikationen zum Ausdruck, die in den chemischen Formeln und Reaktionsgleichungen ihr Abbild finden.

Digitized by Google

Die quantitative Zusammensetzung einer Verbindung aus Elementen, z. B. des Traubenzuckers aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff, kann aber noch auf andere Weise als durch die entsprechende Formel $C_6H_{12}O_6$ dargestellt werden, nämlich auf geometrischem Wege.

Wenn eine Verbindung wie der Traubenzucker aus höchstens drei Elementen besteht, welche als bekannt vorausgesetzt sein sollen, so ist ihre quantitative Zusammensetzung von x% C, y% H, z% O durch zwei der drei Größen x, y, z, also beispielsweise durch x und y vollkommen bestimmt, da ja die dritte Größe z mit der Summe der beiden ersteren sich zu 100 ergänzt im Sinne der Gleichung:

$$x + y + z = 100 .$$

Daraus folgt, daß die quantitative Zusammensetzung einer ternären Verbindung mit Hilfe eines zweidimensionalen Koordinatensystems durch einen Punkt in der Ebene dargestellt werden kann.

Eine solche Darstellung ist bereits im Jahre 1892 von Nickel[1]) in seinen graphochemischen Arbeiten gegeben und darauf eine graphische Systematik ternärer Verbindungsgruppen, wie der C-H-O-Verbindungen und der C-H-N-Verbindungen begründet worden.

Nickel hat sich hierbei des gewöhnlichen, rechtwinkligen, sogenannten cartesianischen Koordinatensystems bedient und bereits die wichtigsten Gesetzmäßigkeiten gefunden, welche in den folgenden Darlegungen wiederkehren.

Die Nickelsche Methode bietet jedoch einige Unbequemlichkeiten der Rechnung und der geometrischen Konstruktion. Vielleicht hat das Verfahren deswegen, soviel dem Verfasser bekannt, bis in die letzte Zeit keine Nachahmung und Anwendung auf besondere Fälle gefunden. Erst neuerdings hat Wa. Ostwald[2]) auf die Nickelschen Arbeiten wieder hingewiesen und für eine graphische Systematik der Kohlenwasserstoffe daran angeknüpft.

Die hier beschriebene Methode sucht eine möglichst weitgehende Anwendung des graphischen Verfahrens auf einzelne Verbindungsgruppen, Reaktionen und Reaktionsfolgen bequemer und leichter zu gestalten.

Für die vorliegenden Zwecke werden an Stelle der Gewichtsprozentzahlen x, y, z mit Vorteil die drei entsprechenden Atomprozentzahlen a, b, c eingeführt, welche sich unmittelbar aus



der chemischen Formel, z. B. $C_pH_qO_r$, durch folgende Gleichungen ergeben, in denen die Atomsumme $p + q + r = S$ gesetzt ist:

$$a = \frac{100\,p}{S} \qquad b = \frac{100\,q}{S} \qquad c = \frac{100\,r}{S}.$$

Man erkennt sofort die für die graphische Darstellung wichtige Tatsache, daß das Doppelverhältnis $a:b:c$ gleich dem aus der Formel $C_pH_qO_r$ direkt ablesbaren ganzzahligen Doppelverhältnis $p:q:r$ ist.

Andererseits liegt für die Darstellung ternärer Gebilde die Verwendung von Dreieckskoordinaten an Stelle der gewöhnlichen, rechtwinkligen Koordinaten nahe, weil Dreieckskoordinaten eine symmetrische Behandlung der drei Bestandteile ermöglichen und die Forderung erfüllen, daß ein Punkt durch drei Koordinaten a, b, c bestimmt wird, deren Summe $a + b + c$ konstant ist und gleich 100 gesetzt werden kann.

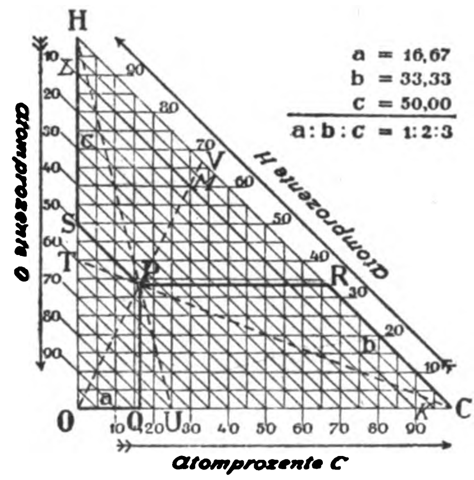


Abb. 1. Atomprozentische Darstellung eines Stoffpunktes P ($C_3H_2O_1$) im rechtwinkligen Dreieck

Dreieckskoordinaten haben besonders für Probleme der Phasenlehre in der Form des gleichseitigen oder Gibbsschen Dreiecks Verwendung gefunden. Da sie in anderen Gebieten verhältnismäßig weniger bekannt sind, möge ihre besondere Beschaffenheit und ihre Beziehung zu den rechtwinkligen Koordinaten hier kurz erläutert werden.

Abb. 1 zeigt ein rechtwinkliges Koordinatensystem. Auf der Abscissenachse sind nach rechts die Atomprozente Kohlenstoff (a), 0—100, aufgetragen. Die Ordinaten stellen die Atomprozente Wasserstoff (b) dar, jedoch sind ihre Zahlenwerte, 0—100, nicht auf der Ordinatenachse selbst, sondern längs der Geraden verzeichnet, welche die Punkte 100% C und 100% H auf beiden Achsen verbindet. Außer den zwei zu den Achsen

Digitized by Google

parallelen Linienscharen ist eine dritte Linienschar parallel zu der oben gekennzeichneten Geraden gezogen und längs der Ordinatenachse von oben nach unten durch eine Skala 0—100 eingeteilt. Diese Skala erlaubt nun, unmittelbar die Atomprozente Sauerstoff (c) als dritte Koordinate abzulesen. Der Koordinatenursprung 0 hat die Bedeutung von 100% Sauerstoff.

In das so gebildete rechtwinklige Dreieck fallen alle Punkte, z. B. der Punkt P, deren Koordinatensumme $a + b + c$ zahlenmäßig gleich 100 ist. Also lassen sich alle C-H-O-Verbindungen durch Punkte innerhalb der Dreiecksfläche abbilden.

Es gibt nun zwei Wege, welche zur Auffindung des Punktes einer bestimmten Verbindung, z. B. der Kohlensäure $C_1H_2O_3$, führen. Man kann zunächst die Atomprozente ausrechnen und findet:

$$\text{Atomprozente C:} \quad a = \frac{100 \cdot 1}{1 + 2 + 3} = \frac{100}{6} = 16{,}67,$$

$$\text{Atomprozente H:} \quad b = \frac{100 \cdot 2}{1 + 2 + 3} = \frac{200}{6} = 33{,}33,$$

$$\text{Atomprozente O:} \quad c = \frac{100 \cdot 3}{1 + 2 + 3} = \frac{300}{6} = 50{,}00.$$

Die so berechneten Zahlengrößen a, b, c werden, entsprechend Abb. 1, auf den drei Skalen durch die Punkte Q, R, S festgelegt. Die zu den Dreiecksseiten bzw. Koordinatenrichtungen durch diese drei Punkte gezogenen Parallelen haben dann in dem gesuchten Punkte P ihren gemeinsamen Schnittpunkt; es genügen daher zur Konstruktion zwei der drei Atomprozentzahlen a, b, c.

Der zweite, bequemere und im folgenden bevorzugte Weg vermeidet die Berechnung der Atomprozentzahlen selbst und benutzt nur die Tatsache, daß ihr Doppelverhältnis $a : b : c$ für den vorliegenden Fall der Kohlensäure $C_1H_2O_3$ gleich $1 : 2 : 3$ ist.

Das Verhältnis je zweier der drei Zahlengrößen a, b, c wird nämlich geometrisch durch die in Abb. 1 punktiert gezeichneten Ecktransversalen CT, HU, OV in folgender Weise bestimmt:

1. Die Ecktransversale CT ist der geometrische Ort aller derjenigen Punkte, für welche das Zahlenverhältnis $b : c$ ($= H : O$) konstant gleich $2 : 3$ ist. Der Punkt T teilt die Dreiecksseite HO in dem umgekehrten Verhältnis $60 : 40 = 3 : 2$.

Digitized by Google

2. Die Ecktransversale *HU* enthält alle diejenigen Punkte, für welche das Zahlenverhältnis $c : a$ $(= O : C)$ konstant gleich 3 : 1 ist. Der Punkt *U* teilt die Dreiecksseite *OC* in dem umgekehrten Verhältnis 25 : 75 = 1 : 3.

3. Auf der Ecktransversalen *OV* liegen alle diejenigen Punkte, für welche das Zahlenverhältnis $a : b$ $(= C : H)$ konstant gleich 1 : 2 ist. Der Punkt *V* teilt die Dreiecksseite *CH* in dem umgekehrten Verhältnis 66,67 : 33,33 = 2 : 1.

Es ist ersichtlich, daß je zwei oder drei Ecktransversalen zur Auffindung des Punktes *P* als ihres Schnittpunktes dienen können. Diese Konstruktion läßt sich aber in außerordentlich einfacher Weise an der Hand der Formel $C_1H_2O_3$ mit alleiniger Benutzung des Lineals ausführen. Denn es ist immer leicht, einen Skalenpunkt bzw. Netzpunkt des Dreiecks festzusetzen, durch den eine bestimmte Ecktransversale gehen muß. Die Punkte *T* und *U* sind selbst Skalenpunkte auf den Dreiecksseiten. Statt Punkt *V* auf der Dreiecksseite *CH* ist der Netzpunkt *M* auf derjenigen parallelen Linie *KL* benutzt, welche durch das Netz in 18 Teile zerlegt und von dem Netzpunkt *M* im Verhältnis 12 : 6 = 2 : 1 geteilt wird.

Es ist stets darauf zu achten, daß sich die Verhältnisse der Prozentzahlen in den durch die Ecktransversalen bestimmten Streckenverhältnissen auf den Dreiecksseiten jeweils umkehren, d. h. die Verhältniszahlen je zweier Bestandteile, z. B. *C* und *H*, sind auf der betreffenden Dreiecksseite (*CH*) von den entgegengesetzten Ecken, also von der Ecke *H* und von der Ecke *C* aus abzulesen.

Die Punkte auf den Dreiecksseiten selbst stellen solche Verbindungen dar, bei denen der durch die gegenüberliegende Ecke gekennzeichnete Bestandteil fehlt. Also liegen auf der Seite *CH* alle Kohlenwasserstoffe, und der Punkt *V* im besonderen bedeutet einen Kohlenwasserstoff, für welchen das Verhältnis $a : b$ $(= C : H) = 33{,}33 : 66{,}67 = 1 : 2$ ist, also z. B. das Äthylen C_2H_4.

Die hier wieder hervortretende Umkehrung des Verhältnisses gestaltet sich besonders anschaulich, wenn man an das Hebelgesetz denkt. Auch hierbei kehrt sich das Verhältnis der an den Enden der Hebelarme wirkenden Gewichte beim Gleichgewichtszustand in dem Verhältnis der Hebelarmlängen um.

Digitized by Google

2. Das **rechtwinklige Dreieck**, das wir der Erörterung bisher zugrunde legten, könnte uns noch weiter dazu dienen, den hier beabsichtigten Zweck der graphischen Darstellung von Verbindungssystemen und Reaktionen zu verfolgen. Es ist nur ein äußerer, die weitere Darlegung kaum beeinflussender Grund, der uns zum Übergang auf das **gleichseitige oder Gibbssche Dreieck** veranlaßt.

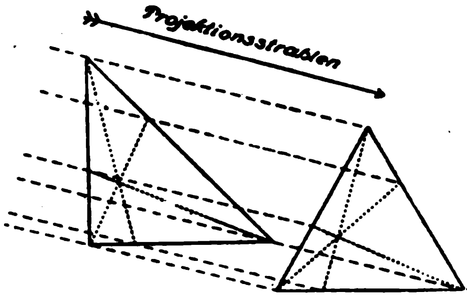


Abb. 2. Überführung des rechtwinkligen Dreiecks in das gleichseitige oder Gibbssche Dreieck durch schiefe Parallelprojektion.

Diesen Übergang kann man sich nach Abb. 2 dadurch erfolgt denken, daß von Abb. 1 durch parallele, im richtigen Winkel zur Ebene des rechtwinkligen Dreiecks geneigte Lichtstrahlen ein Schatten auf eine zweite, zur ersten nicht parallelen Ebene geworfen wird, oder in der Sprache der darstellenden Geometrie durch **schiefe Parallelprojektion**.

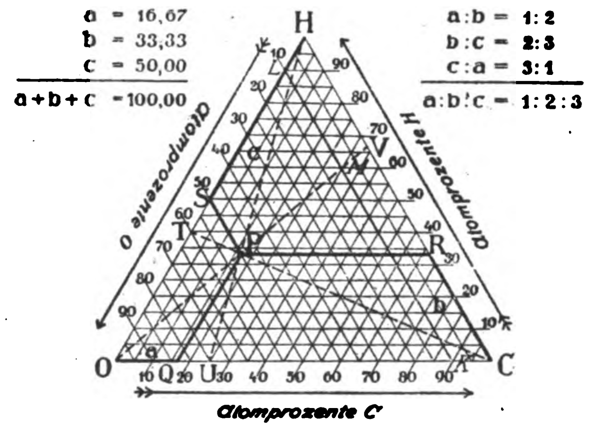


Abb. 3. Atomprozentische Darstellung eines Stoffpunktes *P* ($C_1H_2O_3$) im gleichseitigen oder Gibbsschen Dreieck.

In der Skizze sind beide Dreiecke und die Projektionsstrahlen in die Zeichnungsebene gelegt. Es leuchtet ein und läßt sich an Abb. 3 näher verfolgen, daß in dem Schattenbild an den oben besprochenen geometrischen Beziehungen sich nichts geändert hat. Im besonderen bleibt das Verhältnis, in dem eine Strecke durch einen Punkt geteilt wird, dasselbe.

Digitized by Google

Der Vorteil, welcher gewonnen wird, liegt in der nunmehr erreichten, vollständigen Symmetrie, die sich dadurch bekundet, daß die Skalen für die drei Bestandteile C, H, O im gleichen Maßstabe erscheinen. In diesem übereinstimmenden Maßstabe können nun die Zahlengrößen *a, b, c* unmittelbar als Strecken abgetragen und abgemessen werden. Infolgedessen ist in Abb. 3 die Summe $a + b + c$ der drei Atomprozentzahlen nicht nur, wie oben, zahlenmäßig gleich 100; vielmehr ist jetzt die Streckensumme $a + b + c$ wirklich gleich der Seite des gleichseitigen Dreiecks, welche die Strecke 100 darstellt. Ferner ist nunmehr das Doppelverhältnis $a : b : c$ der drei Prozentzahlen gleich dem Streckenverhältnis der Koordinatenlängen *a, b, c*.

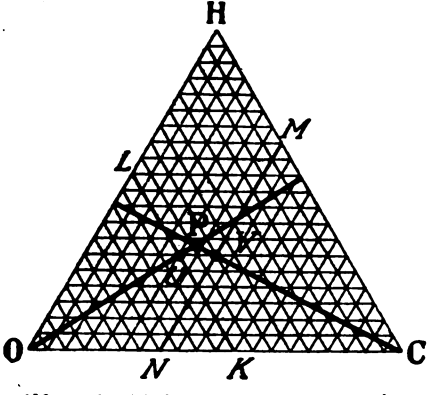


Abb. 4. Zwei Ecktransversalen zur Auffindung eines Stoffpunktes *P* ($C_6H_8O_7$).

Der Leser wird gebeten, die an Hand der Abb. 1 gegebenen Erläuterungen zur Festsetzung eines Stoffpunktes im Dreieck nochmals unter Betrachtung der Abb. 3 zu verfolgen, um sich einerseits von der wesentlichen Übereinstimmung selbst zu überzeugen, und um andererseits zum leichten Verständnis des Folgenden mit den geometrischen Grundlagen möglichst vertraut zu sein.

3. Um die leichte Auffindung eines bestimmten Stoffpunktes mit Hilfe zweier Ecktransversalen auch an einem komplizierteren Beispiel zu erläutern, ist in Abb. 4 die einfache Konstruktion für die Verbindung $C_6H_8O_7$ (α-Oxyäthan-$\alpha\alpha\beta$-Tricarbonsäure) durchgeführt. Die Ecktransversale durch die Ecke *O* ist mittels des Netzpunktes *U* bestimmt, welcher die zur Seite *CH* parallele Netzlinie *KL* mit 11 Teilungseinheiten im Verhältnis 6 : 5 teilt; der Netzpunkt *V* teilt die zur Seite *HO* parallele Netzlinie *MN* von der relativen Länge 13 im Verhältnis 7 : 6 und bestimmt die Ecktransversale durch die Ecke *C*.

Für alle in diesem Aufsatz behandelten Fälle genügt die

Digitized by Google

in den Abbildungen erfolgte 20fache oder auch nur 10fache Teilung der Dreiecksseite. Das von der Firma Carl Schleicher & Schüll Düren, Rheinland, in Handel gebrachte Dreiecks-koordinatenpapier Nr. $315^1/_2$ weist bei 20 cm Länge der Dreiecksseite eine 100fache Teilung derselben auf. Um darin z. B. die Ecktransversale durch die Ecke O für das Verhältnis $C : H = 27 : 56$ (wie im Heptakosan, Cerylalkohol) zu bestimmen, sucht man diejenige zur Seite CH parallele Netzlinie auf, welche $27 + 56 = 83$ Teilungseinheiten mißt, und legt auf ihr den Teilungspunkt für das Verhältnis 27 : 56 im entgegengesetzten Richtungssinne fest. Erst wenn die Summe der beiden kleinstmöglichen Verhältniszahlen 100 überschreitet, ist man auf Interpolation zwischen den Netzpunkten angewiesen.

Falls für eine bisher unbekannte ternäre Verbindung nur die Daten der Elementaranalyse in Gewichtsprozenten vorliegen, etwa x% C, y% H, z% O, berechnet man in bekannter Weise die Bruttoformel und verfährt, wie eben beschrieben. Wenn man jedoch wegen noch vorhandener Unsicherheit die Festlegung einer bestimmten Bruttoformel vermeiden will, kann man aus den Gewichtsprozentzahlen x, y, z die Atomprozentzahlen a, b, c durch folgende Gleichungen ableiten:

$$a = \frac{100 \cdot \frac{x}{12}}{\frac{x}{12} + \frac{y}{1{,}008} + \frac{z}{16}},$$

$$b = \frac{100 \cdot \frac{y}{1{,}008}}{\frac{x}{12} + \frac{y}{1{,}008} + \frac{z}{16}}$$

$$c = \frac{100 \cdot \frac{z}{16}}{\frac{x}{12} + \frac{y}{1{,}008} + \frac{z}{16}}.$$

Zwei der so berechneten Zahlen, etwa a und b, sind dann, wie in Abb. 3 auf den entsprechenden Dreiecksseiten als Koordinatenlängen abzutragen. Der gesuchte Stoffpunkt ergibt sich mit Hilfe der Seitenparallelen auf dem zuerst beschriebenen umständlicheren Wege. Nach einiger Übung gelingt es aber leicht, aus zwei Pro-

Digitized by Google

zentzahlen den richtigen Stoffpunkt mit hinreichender Sicherheit zu bestimmen, ohne die Konstruktion wirklich auszuführen.

4. Im vorhergehenden haben wir die Grundlagen zur graphischen Systematik ternärer Verbindungsgruppen gewonnen. Als Beispiel sind in Abb. 5 die C-H-O Verbindungen $C_1H_yO_r$ und $C_2H_yO_r$ gewählt. Das ganze System zerfällt in Gruppen von solchen Verbindungen, deren Punkte auf je einer Ecktransversalen durch die Ecke *O* liegen, also jeweils ein konstantes Verhältnis $C:H$ aufweisen. An der Spitze stehen die C-freien

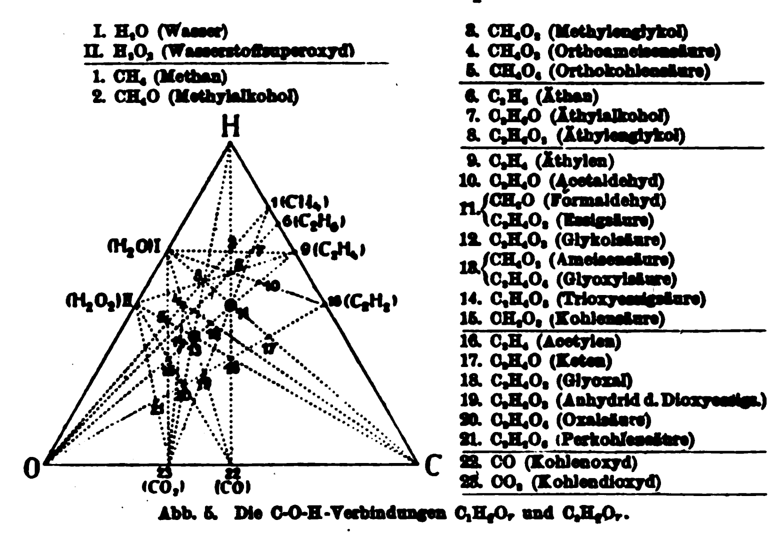


Abb. 5. Die C-O-H-Verbindungen $C_1H_yO_r$ und $C_2H_yO_r$.

Verbindungen I (H_2O) und II (H_2O_2) mit dem Verhältnis $C:H = 0$. Es folgen die Verbindungen 1—5 mit dem Verhältnis $C:H = 1:4$; hierauf die Verbindungen 6—8 mit dem Verhältnis $C:H = 1:3$ usf. Den Schluß bilden die H-freien Verbindungen 22 (CO) und 23 (CO_2) mit dem Verhältnis $C\ H = \infty$. Innerhalb der Gruppen ist nach steigendem Verhältnis $O:C$ numeriert.

In den Punkten 11 und 13 fallen je zwei polymere Verbindungen zusammen, nämlich in Punkt 11 Formaldehyd (CH_2O) und Essigsäure ($C_2H_4O_2$), in Punkt 13 Ameisensäure (CH_2O_2) und Glyoxylsäure ($C_2H_4O_4$). Wie solche in einen Punkt fallende Polymere bei der quantitativen Auswertung von Reaktionen sich unterscheiden, wird bald auseinandergesetzt werden.

Digitized by Google

Zunächst möge nur qualitativ gezeigt werden, wie die Beziehungen und Reaktionen zwischen den dargestellten Verbindungen in dem graphischen System ihr geometrisches Abbild finden.

Wir fassen zu diesem Zweck zunächst die drei durch den Punkt 9 des Äthylens gehenden Transversalen ins Auge. Auf der Geraden I—9 liegen die Verbindungen 2 (Methylalkohol) und 7 (Äthylalkohol); auf der Geraden II—9 die Verbindungen 3 (Methylenglykol) und 8 (Äthylenglykol); auf der Ecktransversalen 0—9 die Verbindungen 11 (Formaldehyd) und 10 (Acetaldehyd) einerseits, sowie 13 (Ameisensäure) und 11 (Essigsäure) andererseits. Man erkennt die allgemeine Regel, daß jede Verbindung mit ihren höheren Homologen auf einer durch Punkt 9 gehenden geraden Linie liegt. Homologe Verbindungen unterscheiden sich aber voneinander um ein Einfaches oder Mehrfaches der Methylengruppe ($-CH_2-$), die durch den Punkt 9 dargestellt ist, beispielsweise entsprechend der Gleichung:

$$\underset{\text{Methylalkohol}}{CH_4O} + \underset{\text{Methylen}}{-CH_2-} = \underset{\text{Äthylalkohol}}{C_2H_6O}$$

Man stelle nochmals fest, daß der Punkt 7 des Äthylalkohols auf der Verbindungslinie zwischen Punkt 2 des Methylalkohols und Punkt 9 des Methylens ($-CH_2-$) liegt; die Verallgemeinerung dieser Tatsache führt zu folgender Regel:

Wenn ein Stoff durch Verbindung zweier Stoffe entsteht (oder entstanden gedacht werden kann), so liegt der Punkt des Verbindungsproduktes auf der Geraden zwischen den beiden Punkten der Ausgangsstoffe; und umgekehrt:

Wenn eine Verbindung in zwei verschiedene Stoffe zerfällt (oder zerfallen gedacht werden kann), so liegen die beiden Punkte der Zerfallsprodukte mit dem Punkte des Ausgangsstoffes und zu beiden Seiten desselben auf einer geraden Linie.

Für die Allgemeingültigkeit dieser Regel bietet Abb. 5 eine weitere Reihe von Beispielen; es mögen die folgenden herausgegriffen werden:

Auf der Geraden 9—I liegt Punkt 7 (Äthylalkohol) zwischen 9 (Äthylen) und I (Wasser); die Gerade 9—I stellt somit die Reaktion

$$\underset{\text{Äthylen}}{C_2H_4} + \underset{\text{Wasser}}{H_2O} = \underset{\text{Äthylalkohe}}{C_2H_6O}$$

Digitized by Google

dar, welche durch Vermittlung von Schwefelsäure wirklich stattfindet und beim Leiten des Äthylalkohols durch glühende Röhren im umgekehrten Sinne erfolgt.

Die Gerade 16—I enthält die Punkte 16 (Acetylen) und I (Wasser), sowie zwischen diesen beiden den Punkt 10 (Acetaldehyd); es wird somit die Reaktion

$$\underset{\text{Acetylen}}{C_2H_2} + \underset{\text{Wasser}}{H_2O} = \underset{\text{Acetaldehyd}}{C_2H_4O}$$

abgebildet, die neuerdings unter Vermittlung von Quecksilberchlorid als Katalysator zur technischen Gewinnung von Äthylalkohol und Essigsäure im großen durchgeführt wird.

Die Essigsäure zerfällt bekanntlich beim Erhitzen ihres Natriumsalzes mit Natronkalk in Methan und Kohlendioxyd, gemäß der Gleichung:

$$\underset{\text{Essigsäure}}{C_2H_4O_2} = \underset{\text{Methan}}{CH_4} + \underset{\text{Kohlendioxyd;}}{CO_2}$$

tatsächlich liegt der Punkt 11 (Essigsäure) zwischen den Punkten 1 (Methan) und 23 (Kohlendioxyd) und mit ihnen auf einer Geraden.

Wenn wir den Punkt 11 dem in der Pflanzenzelle polymerisierten Formaldehyd, d. h. dem Traubenzucker, $C_6H_{12}O_6$ ($= 6CH_2O$), zuschreiben, so stellt die Gerade des vorigen Beispiels auf der Strecke zwischen 7 (Äthylalkohol) und 23 (Kohlendioxyd) den Gesamtverlauf der alkoholischen Gärung dar:

$$\underset{\text{Traubenzucker}}{C_6H_{12}O_6} = \underset{\text{Äthylalkohol}}{2\,C_2H_6O} + \underset{\text{Kohlendioxyd.}}{2\,CO_2}$$

Ferner sei darauf hingewiesen, daß auf der Geraden 22—I die Ameisensäure (13) als Hydrat des Kohlenoxyds (22) erscheint, während auf der Geraden 23—I die Kohlensäure (15) sich als Hydrat des Kohlendioxyds (23) präsentiert.

Nunmehr wird auch verständlich erscheinen, daß alle denkbaren Kohlenhydrate, welche einerseits durch $C_m(H_2O)_n$, andererseits durch $x\,CH_2O - y\,H_2O$ darstellbar sind, auf der Geraden 11—C liegen müssen.

Abb. 6 faßt die allgemeinen Ergebnisse nochmals zusammen und weist die Linien einiger homologer Reihen, sowie die Linie der Kohlehydrate auf. Durch Punkte und Formeln sind jeweils nur die ersten Glieder der Reihe hervorgehoben worden. Die Pfeile deuten die Richtung steigenden Kohlenstoffgehaltes an.

Digitized by Google

Die Abbildung zeigt ferner, wie neben den Ecktransversalen oft auch andere Transversalen des Dreiecks zur Auffindung bestimmter Stoffpunkte dienen können; alle verzeichneten Punkte sind ausschließlich mit Hilfe der dargestellten Linien gewonnen worden.

In analoger Weise können natürlich auch andere ternäre Verbindungssysteme, etwa die Kohlenstoff-Wasserstoff-Stickstoffverbindungen oder die Stickstoff-Wasserstoff-Sauerstoffverbindungen graphisch zum Ausdruck gebracht werden. Wir beschränken uns hier auf die Kohlenstoff-Wasserstoff-Sauerstoffverbindungen, weil sie für die Abbildung einzelner biochemisch wichtiger Reaktionen besonders günstige Beispiele geben.

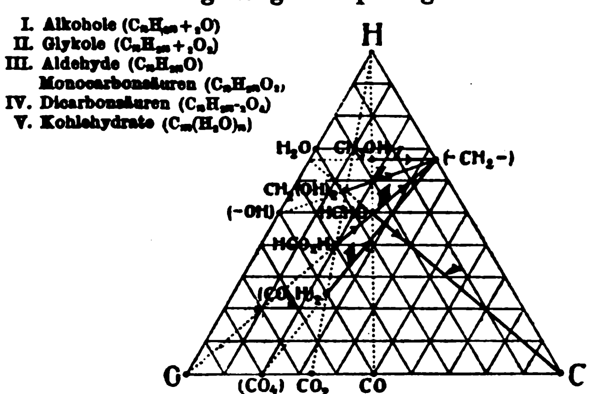


Abb. 6. Einige homologe Reihen und die Kohlehydrate.

5. Bei der im folgenden behandelten Auswahl solcher Reaktionen mögen auch die quantitativen Verhältnisse Berücksichtigung finden.

Denken wir uns zunächst einmal die graphische Darstellung in Gewichtsprozenten durchgeführt. Die beiden Endpunkte einer geraden Linie mögen zwei Stoffe repräsentieren; ein dritter, zwischen den beiden Endpunkten auf derselben Strecke liegender Punkt stelle ein Verbindungsprodukt beider Stoffe dar; dann gilt in bezug auf das Teilungsverhältnis die dem schon erwähnten Hebelgesetz entsprechende Regel:

Bei gewichtsprozentischer Darstellung teilt der Punkt des Verbindungsproduktes die Reaktionslinie im umgekehrten Verhältnis der Gewichte der in die Reaktion eintretenden Ausgangsstoffe.

Digitized by Google

Abb. 7 zeigt oben das Verhältnis bei gewichtsprozentischer Darstellung für die erwähnte Aldehydsynthese: $C_2H_2 + H_2O = C_2H_4O$. Die beiden Teilstrecken verhalten sich umgekehrt wie die zugehörigen Molekulargewichte (26 und 18), und zwar wie die einfachen Molekulargewichte, deshalb, weil in der Gleichung nur der Zahlenfaktor 1 vor den Formeln der einzelnen Bestandteile vorkommt; wenn die Gleichung höhere Faktoren aufweist, sind die zugehörigen Molekulargewichte damit zu multiplizieren.

Bei atomprozentischer Darstellung spielt nun die Anzahl der beteiligten Atome oder die Atomzahl dieselbe Rolle, wie oben das Gewicht, und die Atomsumme der einzelnen Formel spielt dieselbe Rolle wie oben das Molekulargewicht. Daher nimmt obiger Satz folgende Gestalt an:

Bei atomprozentischer Darstellung teilt der Punkt des Verbindungsproduktes die Reaktionslinie im umgekehrten Verhältnis der Atomzahlen der in die Reaktion eintretenden Ausgangsstoffe.

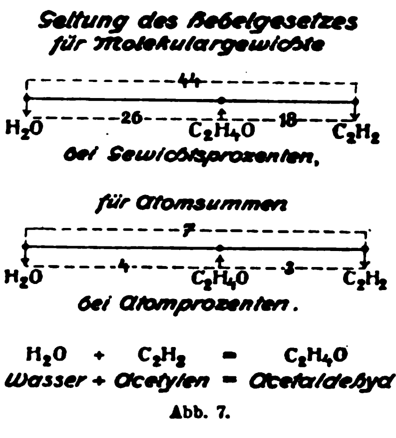


Abb. 7.

Dementsprechend zeigt für die Bildung des Acetaldehyds aus Acetylen und Wasser Abb. 7 unten das umgekehrte Verhältnis der Atomsummen (4 und 3) der Ausgangsstoffe, und zwar der einfachen Atomsummen deshalb, weil in der Gleichung nur der Zahlenfaktor 1 vor den Formeln der einzelnen Bestandteile vorkommt; wenn die Gleichung höhere Faktoren aufweist, sind die zugehörigen Atomsummen damit zu multiplizieren.

Also tritt bei atomprozentischer Darstellung in dem Teilverhältnis der Reaktionslinie das **ganzzahlige** Verhältnis der Atomsummen oder einfacher Multipla derselben zutage, während das bei gewichtsprozentischer Darstellung hervortretende Verhältnis der Molekulargewichte nicht streng ganzzahlig ist; außerdem bieten die Atomsummen den Vorteil, daß sie viel kleinere Zahlen bilden, als die Molekulargewichte.

Digitized by Google

Für die Quantität des Verbindungsproduktes ist nun die Länge des ganzen Hebels, d. h. die Summe der beiden Hebelarme, bzw. Teilstrecken maßgebend. In Abb. 7 ist diese Summe oben — für Gewichtsprozente — verhältnismäßig $26 + 18 = 44$, also das einfache Molekulargewicht des Acetaldehyds; dagegen ist unten — für Atomprozente — die Summe verhältnismäßig $4 + 3 = 7$, also die einfache Atomsumme des Acetaldehyds. Wenn in der Reaktionsgleichung die Formel des Verbindungsproduktes einen höheren Faktor als 1 hat, ist wieder das Molekulargewicht bzw. die Atomsumme mit diesem Faktor zu multiplizieren, um die Quantität des Verbindungsproduktes mit der Länge des ganzen Hebels in Übereinstimmung zu bringen.

Wie sich die Verhältnisse ganz analog bei Zerfallsreaktionen, z. B. $CH_2O_2 = CO + H_2O$, gestalten, braucht wohl nicht besonders erörtert zu werden.

Nunmehr ist auch die Frage geklärt, wie Polymere, die graphisch in einen Punkt zusammenfallen, quantitativ zu unterscheiden und zu behandeln sind. Das Molekulargewicht bzw. die Atomsumme einer polymeren Verbindung ist ein ganzzahliges Vielfaches des Molekulargewichtes bzw. der Atomsumme der einfachen Verbindung. Der Traubenzucker beispielsweise ist der Formel entsprechend als $C_6H_{12}O_6 = 6 \cdot CH_2O$ zu bewerten und hat die Atomsumme 24.

6. Als Anwendungsbeispiele seien nunmehr einige Reaktionen erläutert, die besonders für den Biochemiker von Interesse sind.

In Abb. 8 stellt die stark ausgezogene Linie die Ketonspaltung der Acetessigsäure dar, welche nach der Gleichung verläuft:

$$C_4H_6O_3 = C_3H_6O + CO_2$$

Acetessigsäure — Aceton — Kohlendioxyd.

Die Atomsummen sind: für Acetessigsäure (P) = 13, für Aceton (Q) = 10, für Kohlendioxyd (R) = 3. Aus der Zeichnung läßt sich leicht

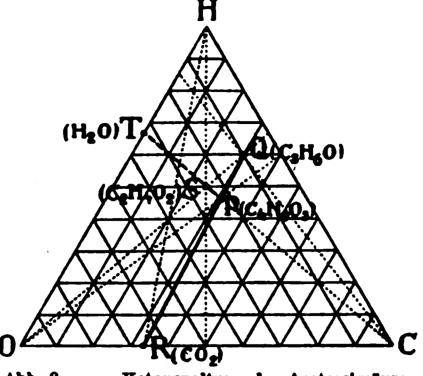


Abb. 8. —— Ketonspaltung der Acetessigsäure $C_4H_6O_3 = C_3H_6O + CO_2$
---- Säurespaltung der Acetessigsäure $C_4H_6O_3 + H_2O = 2\,C_2H_4O_2$.

ermitteln, daß das Streckenverhältnis $RQ : PR : PQ = (1 \cdot 13) : (1 \cdot 10) : (1 : 3)$ ist. Also kommt überall nur der Faktor 1 in Frage.

Die punktierte Linie in Abb. 8 gibt die Säurespaltung der Acetessigsäure wieder nach dem Reaktionsschema:

$$\underset{\text{Acetessigsäure}}{C_4H_6O_3} + \underset{\text{Wasser}}{H_2O} = \underset{\text{Essigsäure}}{2\,C_2H_4O_2}.$$

Die Atomsummen sind: für Acetessigsäure (P) = 13, für Wasser (T) = 3, für Essigsäure (S) = 8. Als Streckenverhältnis folgt aus der Zeichnung: $ST : SP : TP = 13 : 3 : 16 = (1 \cdot 13) : (1 \cdot 3) : (2 \cdot 8)$; es kommt also der Faktor 2 auf der rechten Seite der Reaktionsgleichung auch graphisch zum Ausdruck.

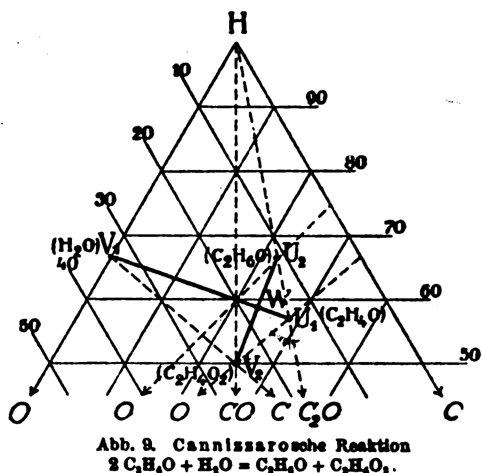


Abb. 9. Cannizzarosche Reaktion
$2\,C_2H_4O + H_2O = C_2H_6O + C_2H_4O_2$.

Wenn auf eine Verbindungsreaktion:

$$U_1 + V_1 = W$$

eine Zerfallsreaktion:

$$W = U_2 + V_2$$

folgt, so ergibt sich aus den beiden Teilgleichungen das häufige Schema:

$$U_1 + V_1 = U_2 + V_2.$$

Graphisch wird eine solche Reaktion durch zwei sich schneidende Strecken abgebildet, deren Schnittpunkt einem angenommenen Additionszwischenprodukt W entspricht.

Als Beispiel ist in Abb. 9 die Cannizzarosche Reaktion des Acetaldehydes behandelt, die bekanntlich darin besteht, daß 2 Mol. Aldehyd mit 1 Mol. Wasser sich zu 1 Mol. Alkohol und 1 Mol. Carbonsäure umsetzen:

$$\underset{\text{Acetaldehyd}}{2\,C_2H_4O} + \underset{\text{Wasser}}{H_2O} = \underset{\text{Äthylalkohol}}{C_2H_6O} + \underset{\text{Essigsäure}}{C_2H_4O_2}.$$

Zur Darstellung dient hier nur die obere, entsprechend vergrößerte Ecke des Gibbsschen Dreiecks. Die Atomsummen für die linke Seite der Gleichung sind: für Acetaldehyd (U_1) = 7, für Wasser (V_1) = 3. Das Streckenverhältnis $WV_1 : WU_1 : V_1U_1$ ist gleich

Digitized by Google

14 : 3 : 17 oder (2 · 7) : (1 · 3) : (1 · 17). Die Atomsummen für die rechte Seite der Gleichung sind: für Äthylalkohol (U_2) = 9, für Essigsäure (V_2) = 8. Das Streckenverhältnis $V_2U_2 : WV_2 : WU_2$ ist gleich (1 · 17) : (1 · 9) : (1 · 8).

Man konstatiere die Übereinstimmung der Streckenverhältnisse mit der Reaktionsgleichung und beachte, daß für beide Reaktionslinien die Verhältniszahl für das Zwischenprodukt *W* gleich, nämlich 1 · 17, ist. Dies ist eine notwendige Bedingung der Gleichung und trifft meist unmittelbar zu. Andernfalls stehen die beiden für *W* zunächst gefundenen Werte im Verhältnis einfacher ganzer Zahlen, mit denen die beiden Teilgleichungen wechselseitig zu multiplizieren sind, um die Schlußgleichung

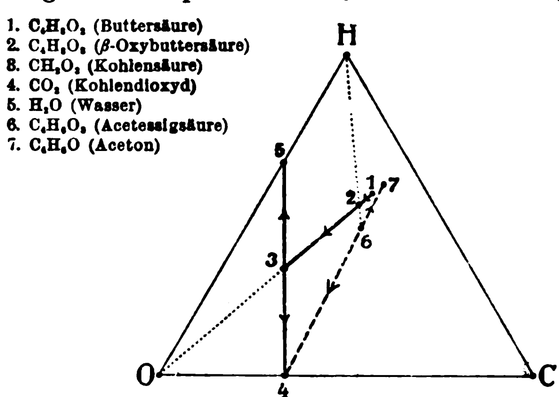


Abb. 10. —— normaler, ---- pathologischer Abbau der Buttersäure.

zu befriedigen. Die einfache Kontrolle der letzteren liegt darin, daß die Summe der Atomzahlen auf beiden Seiten die gleiche sein muß.

Wie sich eine Folge biochemisch zusammenhängender Prozesse graphisch abbildet, wird durch Abb. 10 an dem Abbau der Buttersäure im tierischen Organismus gezeigt. Man nimmt an, daß die Buttersäure (1) zunächst zu β-Oxybuttersäure (2) oxydiert und dann weiter zu Kohlensäure (3) bzw. zu Kohlendioxyd (4) und Wasser (5) verbrannt wird. Die stark ausgezogenen Linien der Abb. 10 geben diese Reaktionsfolge wieder und zeigen, daß der Oxydationsvorgang ausschließlich durch direkte Sauerstoffaufnahme erfolgt.

Von der β-Oxybuttersäure (2) zweigt sich aber eine andere Reaktionsfolge ab, die in Abb. 10 durch punktierte Linien gekenn-

Digitized by Google

zeichnet ist. Es setzt eine Oxydation ein, die in der Entziehung von Wasserstoff besteht und zur Acetessigsäure (6) führt, welche die oben erörterte Ketonspaltung in Kohlendioxyd (4) und Aceton (7) erfährt. Es ist bekannt, daß die letztere Umwandlung der β-Oxybuttersäure besonders bei pathologischen Stoffwechselstörungen, vor allem bei Diabetes in Erscheinung tritt.

Abb. 10 läßt auch den großen energetischen Verlust erkennen, den der Körper durch Vorwalten der letzten Reaktionsfolge erleidet. Da Acetessigsäure (6) auf einer viel niedrigeren Oxydationsstufe als Kohlensäure (3) steht, geht dem Körper die entsprechende Menge Oxydationsenergie verloren, denn die Acetessigsäure wird nicht weiter oxydiert, sondern nur gespalten. Das eine Spaltungsprodukt, das Aceton (7), hat sogar, wie aus der Zeichnung deutlich hervorgeht, eine niedrigere Oxydationsstufe als die Buttersäure (1), von der wir ausgegangen waren. Infolgedessen verläßt den Körper bei der Acetonurie eine beträchtliche Menge unausgenutzter chemischer Energie.

Als weiteres Beispiel sei an Abb. 11 eine Reaktionsfolge etwas ausführlicher behandelt, welche den Lesern dieser Zeitschrift durch die Arbeiten Neubergs[3]) und seiner Mitarbeiter besonders vertraut sein dürfte, nämlich die Hefegärung der Hexosen. Insgesamt folgt die normale Gärung bekanntlich der einfachen, auf Gay-Lussac zurückgehenden Gleichung: $C_6H_{12}O_6 = 2\ C_2H_6O + 2\,CO_2$, die wir schon früher gelegentlich angeführt haben. Nachdem sich die verschiedensten Vermutungen über den wirklichen Verlauf und die Zwischenstufen des Prozesses als unhaltbar erwiesen hatten, konnte Neuberg mit großer Wahrscheinlichkeit die Brenztraubensäure, $C_3H_4O_3$, als erstes Spaltprodukt der Kohlenstoffkette des Zuckers hinstellen, die unter dem Einfluß des Fermentes „Carboxylase" weiter in Kohlendioxyd, CO_2, und Acetaldehyd, C_2H_4O, zerfällt. Während dieser Zwischenprozeß der Gärung immer klarer in den Vordergrund trat, war über den Anfangsprozeß, die Bildung der Brenztraubensäure aus Zucker, und über den Endprozeß, den Übergang des Aldehyds in Alkohol, bis vor kurzem noch keine Klarheit erzielt. Denn abgesehen von den noch der Lösung harrenden Konstitutionsfragen des Anfangsprozesses, war die Frage nach dem Ursprung der Oxydationswirkung auf der einen, der Reduktionswirkung auf der anderen Seite offen geblieben.

Digitized by Google

Die Problemstellung wird durch Abb. 11 erläutert. Der Zerfall der Brenztraubensäure in Kohlendioxyd und Acetaldehyd stellt eine vollständige Reaktion dar;

$$\underset{\text{Brenztraubensäure}}{C_3H_4O_3} = \underset{\text{Kohlendioxyd}}{CO_2} + \underset{\text{Acetaldehyd}}{C_2H_4O}\,.$$

Für den Übergang des Zuckers in Brenztraubensäure einerseits und den Übergang des Acetaldehyds in Äthylalkohol andererseits fehlt jedoch je ein Zweig der Reaktionslinie, so daß es zunächst zweifelhaft erschien, ob der Alkohol tatsächlich unmittelbar und ausschließlich aus dem Aldehyd hervorgeht.

Neuberg und Kerb haben diese beiden Prozesse dadurch in Zusammenhang gebracht, daß sie eine Cannizzarosche Reaktion annahmen, die zwischen Methylglyoxal, einer mutmaßlichen Vorstufe der Brenztraubensäure, und Acetaldehyd stattfindet.

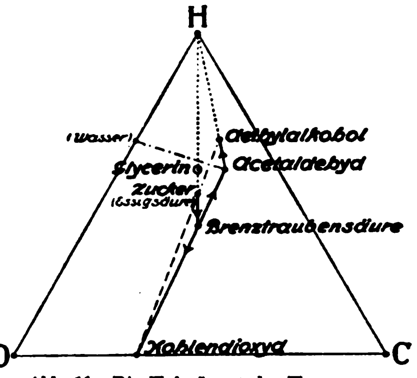


Abb. 11. Die Hefegärung der Hexosen.

Einen ähnlichen Zusammenhang der beiden einseitigen Reaktionszweige stellt eine Vorstellung von Kostytschew[4]) her, welcher eine einfache Koppelung vermutet. Das Wesen gekoppelter Reaktionen besteht aber darin, daß sie einen gemeinsamen Teilnehmer haben, der jedoch versteckt bleiben kann, indem er von der einen Reaktion in demselben Maße verbraucht, wie von der anderen gebildet wird. Graphisch läßt sich eine solche versteckte Zwischenstufe zweier einfach gekoppelter Reaktionen sehr leicht aufdecken; sie entspricht dem Schnittpunkt der beiden Reaktionslinien. Abb. 11 führt so unzweideutig auf den Wasserstoff, der beim Übergang des Zuckers in Brenztraubensäure übrigbleibt, um sofort den Aldehyd zu reduzieren. Unsere Skizze zeigt, wie durch diese Theorie ein geschlossenes Reaktionssystem geschaffen ist, welches wenigstens das Problem des Stoffumsatzes bei Annahme der Zwischenprodukte Brenztraubensäure und Acetaldehyd widerspruchsfrei löst.

Digitized by Google

Der zur Stützung dieser Theorie erforderliche experimentelle Nachweis von Acetaldehyd als Vorstufe des Äthylalkohols ist erst neuerdings Neuberg im Anschluß an seine Studien über alkalische Gärung geglückt, wobei es möglich wurde, den Acetaldehyd in großen Mengen, bis zu 75% der Theorie, als Bisulfitverbindung abzufangen und der Reduktion zum Alkohol zu entziehen.

Unsere Skizze läßt leicht die Wirkung dieses Erfolges erkennen. Wenn der Acetaldehyd vor weiterer Reaktion geschützt wird, so wird der Reaktionsring gesprengt und die Koppelung durch den Wasserstoff illusorisch gemacht. Freier Wasserstoff tritt aber trotzdem nicht auf. Unsere graphische Methode verlangt infolgedessen ein anderes Reaktionsprodukt auf der Verbindungslinie Zucker — Brenztraubensäure, und zwar auf der Verlängerung über den Punkt des Zuckers hinaus. Ein solches liegt tatsächlich im Glycerin vor, welches in schwach alkalischer Natriumsulfitlösung neben Acetaldehyd in korrelativer Menge von Neuberg und Reinfurth aufgefunden ist und dabei in solchen Mengen entsteht, daß es nach einem entsprechenden technischen Verfahren von Connstein und Lüdecke[5]) für die Kriegsindustrie im großen gewonnen werden konnte.

Weiter gestattet die Reaktionsskizze sofort ein allgemeines quantitatives Urteil über die beiden Gärführungen. In der normalen, sauren Gärung wird dem Zucker auf dem Wege zur Brenztraubensäure nur Wasserstoff entzogen, der in einem Endprodukt, dem Alkohol, wieder erscheint. Der Zucker wird schließlich quantitativ in Alkohol und Kohlendioxyd verwandelt. In dem Maße, als bei alkalischer Gärung die Endreaktion durch Festlegung des Acetaldehyds verhindert ist, was nicht vollständig erreicht werden kann, tritt die dem Acetaldehyd korrelative Menge Glycerin auf, so daß eine sehr weitgehende quantitative Verschiebung der Ausbeuten erfolgen muß.

Der Hauptvorgang der alkalischen Gärung verläuft demnach bei Gegenwart von Natriumbisulfit, bis zu etwa 75% der Theorie, entsprechend der Gleichung:

$$\underset{\text{Traubenzucker}}{C_6H_{12}O_6} = \underset{\text{Glycerin}}{C_3H_8O_3} + \underset{\text{Acetaldehyd}}{C_2H_4O} + \underset{\text{Kohlendioxyd}}{CO_2}.$$

Wie Neuberg und Hirsch kürzlich gezeigt haben, ist es für die Glycerinbildung gleichbedeutend, ob der Acetaldehyd

Digitized by Google

als Bisulfitverbindung abgefangen oder durch eine andere Reaktion der Einwirkung des „Gärungswasserstoffes" entzogen wird. Letzteres gelingt, bis zu annähernd 30% der Theorie, in Natriumbicarbonatlösung, welche einen Teil des Acetaldehydes durch die schon an Abb. 9 erläuterte Cannizzarosche Reaktion unter Zutritt von Wasser in Äthylalkohol und Essigsäure verwandelt. Es entsteht dabei zwar, wie bei der normalen Gärung, Äthylalkohol, jedoch nur zu einem Viertel der normalen Ausbeute, weil nunmehr 2 Mol. Traubenzucker dazu gehören, um 1 Mol. Äthylalkohol neben 1 Mol. Essigsäure zu liefern, entsprechend folgender Gesamtgleichung:

$$\underset{\text{Traubenzucker}}{2\,C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Wasser}}{H_2O} = \underset{\text{Glycerin}}{2\,C_3H_8O_3} + \underset{\text{Äthylalkohol}}{C_2H_6O} + \underset{\text{Essigsäure}}{C_2H_4O_2} + \underset{\text{Kohlendioxyd.}}{2\,CO_2}$$

In Abb. 11 ist diese sekundäre Umwandlung des Acetaldehyds durch das strich-punktierte Streckenkreuz angedeutet.

Die erörterten Beispiele einzelner Reaktionen und Reaktionsfolgen zeigen, wie die graphische Darstellung in geeigneten Fällen ein besonders anschauliches und eindringliches Bild liefert, das die Vorgänge der Stoffumwandlung mit einem Blick leichter übersehen läßt, als ein Schema von Reaktionsgleichungen. Deshalb dürfte zur Illustrierung von experimentell festgestellten oder theoretisch angenommenen Reaktionen die graphische Darstellung oft mit Vorteil neben die entsprechenden Reaktionsgleichungen treten.

Schließlich möge an Abb. 12 dargetan werden, wie auch bei der Erforschung einzelner, bisher unaufgeklärter Naturstoffe die empirischen Daten des Experimentes sich graphisch verfolgen lassen. Es handle sich um eine hochmolekulare, amorphe Substanz, die schwer ganz rein zu erhalten, und deren elementare Zusammensetzung durch die Analyse festgestellt ist, ohne daß mit genügender Sicherheit eine bestimmte Bruttoformel aufgestellt werden kann. Ebenso liegen noch keine sicheren Aufschlüsse über Molekulargröße und Konstitution vor und sollen erst gesucht werden.

Gerade unter den Produkten der Pflanzen- und Tierwelt befinden sich solche Substanzen, deren Aufklärung erst noch bevorsteht. Zu ihnen gehört beispielsweise die charakteristische Holzsubstanz Lignin, welche im Anschluß an das Beckmannsche Strohaufschließungsverfahren[6]) im hiesigen Laboratorium zur Zeit näher studiert wird.

Digitized by Google

Derartige Substanzen setzen oft nicht nur der Reindarstellung, sondern auch der Konstitutionsbestimmung erhebliche Schwierigkeiten entgegen, weil die zur Ermittlung charakteristischer Gruppen herangezogenen Reaktionen, wie die Bestimmung von Methoxyl, Carbonyl, Carboxyl, Hydroxyl u. dgl. keineswegs immer so glatt und quantitativ verlaufen, wie das bei einfacheren Stoffen meist der Fall ist, sei es, daß der komplizierte Molekülbau eine sterische Hinderung bedingt, sei es, daß einsetzende Nebenreaktionen, wie Zerfall oder Kondensation, die erwartete glatte Reaktion stören.

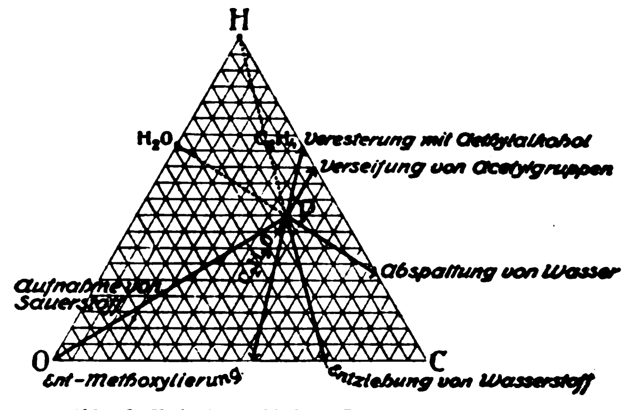


Abb. 12. Verlauf verschiedener Reaktionen eines Stoffes.

In solchen Fällen kann das graphische Verfahren dazu dienen, festzustellen, ob und inwieweit die erwartete Reaktion wirklich eingetreten ist, oder ob die Reaktion vielleicht eine ganz unvermutete Richtung eingeschlagen hat.

Man braucht zu diesem Zweck nur die Analysendaten der ursprünglichen und der durch die Behandlung veränderten Substanz, am besten wieder in Atomprozenten, in das Gibbssche Dreieck einzutragen. Die Verbindungslinie beider so erhaltenen Stoffpunkte gibt dann einen Anhalt über die Richtung der stattgefundenen Reaktion.

Wenn z. B. eine Verseifung von Acetylgruppen stattgefunden hat, so hat der Ausgangsstoff die Kombination $C_2H_4O_2 - H_2O = C_2H_2O$ verloren und der Endpunkt muß auf der Verlängerung der Verbindungslinie zwischen dem Anfangspunkt P und dem Punkt C_2H_2O, und zwar über P hinaus, liegen.

Digitized by Google

Wenn etwa eine Veresterung mit Äthylalkohol erfolgt ist, so hat der Ausgangsstoff die Kombination $C_2H_6O - H_2O = C_2H_4$ gewonnen. Der Endpunkt liegt dann auf der Verbindungslinie zwischen dem Ausgangspunkt *P* und dem Punkt C_2H_4.

Wenn dagegen eine Entmethoxylierung vor sich gegangen ist, so hat der Ausgangsstoff die Kombination $CH_4O - H_2O = CH_2$ verloren. Der Endpunkt liegt dann auf derselben Geraden wie im vorigen Beispiel, jedoch auf der Verlängerung über *P* hinaus.

Die stark ausgezeichneten Pfeillinien der Abb 12 zeigen die mögliche Lage der Endpunkte im Falle der besprochenen Reaktionen an. Außerdem wird noch die Abspaltung von Wasser veranschaulicht, sowie der Unterschied zum Ausdruck gebracht, ob eine Oxydation durch Sauerstoffaufnahme ins Molekül oder Wasserstoffentziehung aus dem Molekül erfolgt ist.

Ist eine bestimmte Reaktion einmal erkannt, so erlaubt die graphische Methode durch Vergleich der theoretischen mit er empirischen Reaktionslinie, etwaige Abweichungen in qualitativer und quantitativer Hinsicht zu übersehen.

7. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die graphische Methode die Möglichkeit gibt, den Verlauf chemischer Vorgänge durch Strecken mit bestimmter Lage, bestimmter Länge und bestimmtem Teilverhältnis abzubilden. Die Strecken unserer Diagramme sind somit ein Abbild des Stoffumsatzes bei chemischen Reaktionen und gleichzeitig ein Vorbild der Richtungen, in denen sich das chemische Denken bewegen muß, um mit den eingangs erwähnten quantitativen Grundgesetzen der Chemie in Übereinstimmung zu bleiben. Auch der chemische Stoffumsatz des Organismus bewegt sich entsprechend solchen geradlinigen Bahnen, wenn auch meist über andere Etappen, als die Laboratoriumsmethoden des Chemikers.

Leider ist die Methode in der hier gegebenen Form auf ternäre Verbindungen beschränkt. Für die Biochemie wäre es besonders erwünscht, wenigstens noch die quaternären C—H—O—N-Verbindungen der Eiweißchemie einbeziehen zu können. An anderer Stelle hat Verfasser[7]) auseinandergesetzt, wie in einzelnen beschränkten Fällen quaternäre Verbindungen in ähnlicher Weise behandelt werden können, und darauf hingewiesen, daß eine

allgemeine Darstellung quaternärer Verbindungen eines dreidimensionalen Koordinatensystems bedarf, dessen Wiedergabe in der Ebene mit Hilfe der Methoden der darstellenden Geometrie zwar möglich ist, jedoch zu Komplikationen führt. Vielleicht findet sich noch ein Kunstgriff zur Überwindung dieser Schwierigkeit und damit zu einem einfachen weiteren Ausbau der Methode.

Zur Ergänzung der vorstehenden Erörterungen möge auf die genannte Stelle auch deshalb verwiesen werden, weil daselbst Darstellung und Begründung teilweise anders behandelt wurden und noch einige weitere Anwendungsbeispiele gegeben sind.

Literatur.

[1]) E. Nickel, Zeitschr. f. physikal. Chemie **10**, 621. 1892; **14**, 93. 1894. — [2]) Wa. Ostwald, Chem.-Ztg. **43**, 121. 1919. — [3]) C. Neuberg, und Mitarbeiter, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie **1**, 114. 1912. Berichte **46**, 2225. 1913; **47**, 2730. 1914. Zahlreiche Aufsätze dieser Zeitschrift, siehe besonders: **53**, 406. 1913; **62**, 489. 1914; **78**, 238. 1916; **89**, 365. 1918; **92**, 234. 1918; **96**, 175. 1919; **98**, 141. 1919. — [4]) S. Kostytschew, Zeitschr. f. physiol. Chemie **79**, 130 u. 359. 1912. — [5]) W. Connstein u. K. Lüdecke, Berichte **52**, 1385. 1919. — [6]) E. Beckmann, Sitzungsberichte der Preußischen Akademie der Wissenschaften, Physik.-math. Klasse 1919, S. 275. Zeitschr. f. angew. Chemie **32** (Aufsatzteil) 81. 1919. — [7]) O. Liesche, „Graphische Darstellung chemischer Verbindungen und Reaktionen im Gibbsschen Dreieck", Zeitschr. f. physikal. Chemie **94**, 663. 1920.

Digitized by Google

Zur physikalisch-chemischen Betrachtung der Gärungsvorgänge.

Von

Wolfgang Ostwald.

(Eingegangen am 9. März 1920.)

Bei der freundlichen Besprechung meiner in dieser Zeitschr. 100, 279ff. publizierten Bemerkungen zur physikalisch-chemischen Theorie der Gärungsvorgänge hat mich C. Neuberg in zwei wichtigen Punkten, wohl wegen der Kürze oder wegen mangelnder Klarheit meiner Ausdrucksweise, mißverstanden:

1. Ich habe niemals daran gezweifelt, daß die theoretisch errechenbare Aldehydausbeute bei der normalen Gärung größer ist als die experimentell gefundene Ausbeute beim Sulfitverfahren. Der Satz von C. Neuberg, S. 290 „Es wird gar nicht, wie Ostwald glaubt, mehr, sondern ganz beträchtlich weniger Azetaldehyd erzeugt", beruht auf einem Mißverständnis, da ich diesen Glauben niemals gehabt oder geäußert habe. Die „Neubildung" bzw. „Mehrbildung" beim Sulfitverfahren, von der S. 280 meiner Notiz die Rede ist, bezieht sich auf den Vergleich der beim Sulfitverfahren experimentell gewonnenen Aldehydmenge zu den bei der normalen Gärung experimentell festgestellten Aldehydspuren.

2. Ich habe nicht „eine besonders günstige Wirkung des (festen) Calciumsulfites erwartet", wie C. Neuberg S. 300 meint. Ich habe vielmehr nur angegeben, daß gerade bei der Anwendung von festen z. B. pulverförmigen Abfangmitteln wie beim Calciumsulfit „das Heranziehen von Adsorptionserscheinungen auch bei einem näheren, z. B. kinetischen Studium des Sulfitverfahrens von Vorteil oder sogar von Notwendigkeit sein kann" (S. 285). Dagegen habe oder hatte ich niemals die Meinung. daß feste, grobdisperse Sulfite wegen des Vorhandenseins von Adsorptionserscheinungen besser, d. h. mit größerer Ausbeute wirken sollen als molekulardisperse, d. h. gelöste Sulfite. Demgemäß liegt auch der Zurückweisung des gegenteiligen Satzes durch C. Neuberg S. 300 ein Mißverständnis zugrunde.

Digitized by Google

Die physikalisch-chemische Betrachtung der Gärungsvorgänge

(vgl. diese Zeitschr. **100**, 289. 1919).

Von

C. Neuberg.

In der voranstehenden Mitteilung bringt Ostwald zum Ausdruck, daß ich ihn wegen Kürze oder mangelnder Klarheit seiner Ausführungen mißverstanden habe. Obgleich alle prinzipiellen Punkte durch meine Abhandlung (diese Zeitschr. **100**, 289. 1919) hinreichend geklärt sind, darf ich darlegen, wie ich zu meiner Auffassung gelangen mußte.

1. Wenn O. (diese Zeitschr. **100**, 282) schreibt: „Solche andere Gründe, die auf die zentrale Rolle des Acetaldehyds hinweisen, liegen nun in der Tat reichlich vor", und wenn er hinzufügt: „Der Verfasser betont, daß er durchaus von der Richtigkeit der Neubergschen Gärungstheorie überzeugt ist", so muß man annehmen, daß er sich auf den Boden dieser Theorie stellt. Dann aber kann man seinen voranstehenden Satz „Vielmehr bedeutet die Reaktion in Gegenwart von Sulfiten von diesem Gesichtspunkte aus außer der Fixierung auch eine Neubildung von Acetaldehyd" (diese Zeitschr. **100**, 280) unmöglich anders auslegen, als ich es l. c. tue.

2. O.s Ausspruch (diese Zeitschr. **100**, 286): „Von Interesse wäre es auch, das hoch disperse gelatinöse $CaSO_3$ ... mit den gröberen, vermutlich weniger wirksamen Sulfitpräparaten zu vergleichen", muß doch wohl zur Ansicht führen, daß der Autor bei dem Calciumsulfit Besonderes erwartet. Daß aber im Gegensatze zu seiner Vermutung ein Adsorptionsvermögen des unlöslichen $CaSO_3$ keine erkennbare Rolle spielt, habe ich schon früher belegt durch Mitteilung der Erfahrung: „Im heterogenen System wirken die unlöslichen Sulfite bei weitem nicht so gut wie im homogenen Medium das gelöste Dinatriumsulfit" (Neuberg, diese Zeitschr. **100**, 300); und weiter hatten Neuberg und Reinfurth (**52**, 1677. 1919) gerade gezeigt, daß der gelatinöse Zustand verschiedener schwefligsaurer Salze den Vorgang in keiner Weise begünstigt. — Bezüglich der Wirkungsweise des Calciumsulfits beim Abfangverfahren liegt also meinerseits gewiß kein Mißverständnis vor.

Digitized by Google

Die drei Vergärungsformen des Zuckers, ihre Zusammenhänge und Bilanz.

Von

Carl Neuberg, Julius Hirsch und Elsa Reinfurth.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die neue Theorie der Gärung, die wir im Jahre 1913 aufgestellt haben[1]), besagt, daß sich am Zuckermolekül intermediär eine Oxydation und Reduktion bestimmter Art abspielt, bevor die als glatter Zerfall erscheinende Auflösung in die Endprodukte Kohlensäure und Äthylalkohol vollzogen ist.

Zu einer solchen Annahme zwingen verschiedene Umstände. Zunächst sind im Gebilde der Hexosen weder die Gruppen der Kohlensäure noch die Reste des Weingeistes präformiert. Da man sich kaum eine andere Vorstellung machen kann, als daß die Gärungskohlensäure letzten Endes auf dem Wege der Decarboxylierung aus einer Carbonsäure hervorgeht, so war auf eine saure Zwischenstufe zu fahnden; diese Säure mußte in chemisch einleuchtender Weise aus dem Zucker ableitbar und tatsächlich vergärbar sein. Bekanntlich hat die früher in Betracht gezogene Milchsäure die letzte und wichtigste der Voraussetzungen nicht erfüllt, wohl aber tat dies die Brenztraubensäure, deren Gärfähigkeit im Jahre 1910 entdeckt worden ist. Bei ihrer Spaltung durch das Hefenferment Carboxylase liefert sie neben Kohlendioxyd den Acetaldehyd, der in nächster Beziehung zum Äthylalkohol steht. Da nun aber die Brenztraubensäure, $C_3H_4O_3$, im Vergleich zum Zucker, $C_6H_{12}O_6$, das Produkt einer höheren Oxydation darstellt, so erwuchs auf diesem Boden die Forderung, daß der einsetzenden Dehydrierung des Zuckermoleküls zur Stufe der Brenztraubensäure eine korrelative Reduktion an einem anderen Orte entsprechen müsse. Die zugrunde liegenden Tatsachen, Vorstellungen und Schlußfolgerungen sind in der erwähnten Gärungstheorie vereinigt. Sie enthält als wesentlichen Bestandteil die durch eingehendste Versuche erwiesene Möglichkeit, die Brenztraubensäure glatt zu Kohlendioxyd und Acetaldehyd zu vergären und den

[1]) C. Neuberg, Monogr. Jena 1913.

Digitized by Google

Acetaldehyd mit Hilfe von Hefe weiter in Äthylalkohol umzuwandeln. Sie bot auch zugleich die Erklärung für das Auftreten des Gärungsglycerins, dessen Bildung auf eine Wechselbeziehung zum Gärungsacetaldehyd zurückgeführt wurde. Ergreift nämlich der „Gärungswasserstoff", d. h. die bei der Oxydation eines Zuckerhalbmoleküls zum Gliede der Brenztraubensäure disponibel gewordene Masse von 2 H-Atomen, statt normalerweise den bei der carboxylatischen Spaltung der Brenztraubensäure entstandenen Acetaldehyd zu Äthylalkohol zu reduzieren, einen Zuckerrest, so muß pro erzeugtem Molekül Acetaldehyd 1 Mol. Glycerin vorhanden sein.

Die Lehre von diesen Zusammenhängen, die sich in verschiedener Weise ausdrücken lassen, konnte zu einer vollkommenen Anerkennung nur dann gelangen, wenn auf experimentellem Wege die Festlegung der formulierten Abbaustufe bewirkt wurde. Das scheinbar so einfache Problem ist erst im Jahre 1916 seiner Lösung zugeführt worden[1]), als die bis dahin nicht überwundene Schwierigkeit behoben war, Reagenzien ausfindig zu machen, welche die biologischen Reaktionen nicht unterbinden, also den Gärungsvorgang unter Festlegung eines Zwischengebildes zu Ende gehen lassen.

Zwei Methoden führten zum Ziele, die wir als „Abfangverfahren" und „Dismutationsverfahren"[2]) bezeichnen. Das Bestreben konnte darauf gerichtet sein, entweder die intermediäre Oxydationsstufe oder den Reduktionsprozeß zu fixieren und somit die Kette der normalen Vorgänge zu unterbrechen. Wir haben vorläufig von der ersten der beiden Möglichkeiten Gebrauch gemacht[3]).

In den sekundären schwefligsauren Salzen fanden wir nun Abfangmittel, die hinreichende Unterschiede in ihrer Affinität zu dem Ausgangsmaterial (dem Zucker), den zu erwartenden carbonylhaltigen Zwischengliedern und dem letzten biochemischen

---

[1]) C. Neuberg und E. Färber, diese Zeitschr. 78, 238. 1916.

[2]) Mit dem Worte Dismutation wird die früher (diese Ztschr. 98, 175. 1918) von uns beschriebene Beziehung zu der zugrunde liegenden Cannizzaroschen Umlagerung ausgedrückt, deren biologischer Katalysator (Battelli und Stern, Parnas, Trier) Mutase benannt ist.

[3]) Man kann auch den „Gärungswasserstoff" durch geeignete Acceptoren fixieren und so ein Abfangverfahren schaffen. Daß dieser Weg gangbar ist, zeigen unsere Untersuchungen über die phytochemischen Reduktionen, bei denen man fremde, reduzierbare Verbindungen als Wasserstoffempfänger fungieren und mit dem Gärungsacetaldehyd um die Hydrierung konkurrieren läßt.

Digitized by Google

Durchgangsprodukt, dem Acetaldehyd, aufweisen. Bekanntlich treten schwefligsaure Salze — nicht nur die sauren, sondern, was weniger beachtet wird, auch die neutralen Sulfite — mit Aldehyden zusammen. Aber die Beständigkeit des Sulfitkomplexes steigt von dem hexose-schwefligsauren Salz zu der entsprechenden Acetaldehyd- bzw. Brenztraubensäure-Verbindung gewaltig an, da die Zerfallskonstante der Doppelverbindungen mit sinkendem Molekulargewicht erheblich abnimmt. Daß die Reaktion nicht bei der Brenztraubensäure haltmacht, liegt daran, daß die Pyruvinat-Sulfite mit besonderer Leichtigkeit vergoren werden[1]). Das zugefügte Reagens, ein beliebiges schwefligsaures Salz, fängt also den Acetaldehyd ab, fixiert ihn in Form der Bisulfitverbindung und entzieht ihn dadurch der Hydrierung zum Äthylalkohol, die sonst den Schlußakt der alkoholischen Gärung bildet. Der bewegliche „Gärungswasserstoff", der durch diese Festlegung der Aldehydstufe von ihr abgedrängt ist, erfaßt ein Zuckerhalbmolekül und reduziert es zu Glycerin. Demgemäß müssen, den Forderungen der Theorie entsprechend, Acetaldehyd und Glycerin in molekularem Verhältnis erscheinen. Bezeichnet man die übliche Zuckerspaltung: $C_6H_{12}O_6 = 2\,C_2H_5 \cdot OH + 2\,CO_2$ als **1. Vergärungsform**, so stellt der Zerfall in Acetaldehyd, Glycerin und Kohlensäure: $C_6H_{12}O_6 = CH_3 \cdot CHO + CO_2 + C_3H_8O_3$ eine **zweite Form der Vergärung**[2]) dar.

Ein anderer Mechanismus liegt dem „Dismutationsverfahren" zugrunde Wieder ist es der Eingriff an der Aldehydphase, der den abgeänderten Gärungsverlauf bedingt. Bei der großen Reaktionsfähigkeit der Aldehyde mußte es möglich sein, einen Weg zu beschreiten, auf dem der Acetaldehyd auch in anderer Weise als durch die Fesselung aus der Reihe der Umgestaltungen herausgeführt wird, beispielsweise durch eine Art von Umlagerung. Die einfache Form einer solchen ist in der Cannizzaroschen Reaktion gegeben. Wir fanden, daß im alkalischen Milieu die Hefe den zwischendurch entstehenden Acetaldehyd durch Umwandlung zu Essigsäure und Äthylalkohol verändert. Da diese Dismutation nun wiederum einer Aus-

[1]) Siehe hierüber C. Neuberg und E. Reinfurth, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **53**, 462. 1920, sowie eine gleichzeitig ebendas., Heft 6, erscheinende ausführliche Mitteilung.

[2]) C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. **89**, 365 u. **92**, 234. 1918.

Digitized by Google

schaltung der Oxydationsstufe Acetaldehyd gleichkommt, so ist es verständlich, daß als entsprechende Reduktionsleistung auch hier die Produktion von Glycerin vor sich geht. Diese Art des Umsatzes, bei dem neben Kohlensäure Essigsäure und Weingeist einerseits und Glycerin andererseits entstehen: $2 C_6H_{12}O_6 + H_2O = 2 CO_2 + CH_3 \cdot COOH + C_2H_5 \cdot OH + 2 C_3H_8O_3$, bezeichnen wir als die **3. Vergärungsform**[1]).

„Abfangverfahren" und „Dismutationsmethode" erreichen dasselbe Ziel, aber auf Wegen, die nicht nur in chemischer, sondern auch in biologischer Hinsicht verschieden sind. Beim Abfangverfahren wird nämlich, soweit bisher bekannt, der im physiologischen Prozesse gebildete Acetaldehyd durch den rein chemischen Zusammentritt mit dem Sulfit an die Kette gelegt. Beim Dismutationsverfahren findet eine Dislocation des Acetaldehyds auf enzymatischem Wege statt. Denn unter den Bedingungen des Experimentes, in Gegenwart der mit CO_2 gesättigten wässerigen Lösungen schwach alkalisch reagierender Salze und bei niederer Temperatur, ist der Acetaldehyd an sich praktisch beständig; ein biologischer Faktor bewirkt die Disproportionierung.

Des öfteren hat man in den letzten Jahren ausgeführt, daß man schwerlich eine Vorrichtung ersinnen könne, die nicht in der Natur vorgebildet sei[2]), und so muß man sich fragen, ob diese scheinbar so gründlich abgeänderten Arten des Gärungsverlaufes unter dem Einflusse zugefügter Chemikalien nicht auch in der Natur vorkommen. Man wird diese Frage bejahen dürfen auf Grund folgender Erfahrungen: Die Gay-Lussacsche Idealformulierung des Gärungsvorganges — wir nannten sie die 1. Vergärungsmöglichkeit — wird niemals in reiner Gestalt verwirklicht, stets entstehen kleine Mengen Acetaldehyd und Glycerin nebenher. Der Aldehyd wird unzweifelhaft auf anaerobem Wege[3]) gebildet, nicht durch Oxydation primär vorhandenen Äthylalkohols, und

[1]) C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. **96**, 175 u. **100**, 304. 1919.

[2]) Das Zitat geht auf den Ausspruch des Aristoteles zurück: *ἡ τέχνη τὴν φύσιν μιμεῖται*; die Literaturstelle ist, wie wir der freundlichen Auskunft des Herrn Prof. E. O. v. Lippmann in Halle entnehmen, die „Physik **2**, 2".

[3]) C. Neuberg und Joh. Kerb, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**, 2730. 1914 sowie C. Neuberg und E. Schwenk, diese Zeitschr. **71**, 126. 1915.

Digitized by Google

er ist während des ganzen Gärverlaufs nachweisbar[1]). Wir haben vor einiger Zeit erörtert, daß Acetaldehyd oder seine Vorstufe, die Brenztraubensäure, auch einer natürlichen Festlegung anheimfallen dürften, indem mit großer Wahrscheinlichkeit aus solchen Bruchstücken des Zuckers zusammen mit Ammoniak die Hefe ihr Körpereiweiß synthetisiert, so daß die normale Glycerinbildung als eine Folge dieser physiologischen Abfangung erscheint. Hier sehen wir die 2. Vergärungsform sich geltend machen. Auch kleine Mengen Säuren, unter denen die Essigsäure vollkommen vorherrscht, treten bei jeder alkoholischen Gärung auf. Ist die für den Ablauf der gewöhnlichen Zuckerspaltung (1. Vergärungsform) notwendige Acidität nicht gegeben, so fängt die Hefe an, auf Kosten des Zuckers Säure, und zwar Essigsäure, zu erzeugen, bis die optimale H-Ionenkonzentration erreicht ist. Jede Verminderung der natürlichen Acidität sucht die Hefe durch eine solche Vornahme der Säureproduktion auszugleichen. Hierzu wird sie unter natürlichen Verhältnissen, z. B. bei Anwesenheit carbonathaltiger Wässer, nicht selten Gelegenheit haben, so daß wir auch die Betätigung nach der 3. Vergärungsform als eine den Hefen geläufige Leistung betrachten dürfen. Wir müssen uns weiter vorstellen, daß durch außergewöhnliche Verschiebungen des Milieus, zu deren Beseitigung die normale Regulationsfähigkeit der Hefezellen nicht ausreicht, die extremen Bedingungen geschaffen werden, unter denen dann in verstärktem Maße die 2. oder 3. Vergärungsform zutage treten.

Nachdem wir weiterhin dargetan haben — und das soll in späteren Mitteilungen noch ausführlicher geschehen —, daß auch andere Gärungsvorgänge, wie die bedeutsame Umsetzung der Kohlehydrate durch Colibacillen sowie Buttersäureerreger, durch pathogene Mikroorganismen usw., einen ähnlichen Mechanismus[2]) haben, nachdem wir gleichfalls für die Essiggärung[3]) den Weg über die Aldehydstufe aufzeigen konnten, schien es uns wichtig, an dem zurzeit besten Studienobjekt, der Hefe, die allgemeinen Zusammenhänge klarzustellen. Es liegt im Wesen der beschriebenen Beziehungen begründet, daß sich keine der drei Vergärungsformen in idealer Fassung abspielen kann. Einerseits

[1]) C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. **100**, 304. 1919.
[2]) C. Neuberg und F. F. Nord, diese Zeitschr. **96**, 133. 1919.
[3]) C. Neuberg und F. F. Nord, diese Zeitschr. **96**, 158. 1919.

Digitized by Google

sind es in letzter Linie Ursachen des Zellstoffwechsels, z. B. der interne Bedarf an Oxydationsstufe (Acetaldehyd, Brenztraubensäure), die schon für gewöhnlich eine Glycerinproduktion, also Eintritt der 2. oder 3. Vergärungsform, veranlassen; es ist andererseits bislang nicht möglich gewesen, die Zelle oder ihre Fermente selbst bei ganz unangepaßter Umgebung zur ausschließlichen Arbeit in der abweichenden Richtung zu zwingen, so daß neben der 2. oder 3. Vergärungsform auch die 1. abläuft.

C. Neuberg und J. Hirsch haben bereits gezeigt[1]), daß das von der Theorie vorgesehene molekulare Verhältnis von Acetaldehyd und Glycerin innerhalb der gesamten Gärführung obwaltet. Die Äquivalentbeziehung zwischen Acetaldehyd und Glycerin besteht in jedem Augenblicke des Gärungsvorganges. Die Menge des Sulfits bedingt, wie wir schon früher eingehend dargetan haben, die absoluten Ausbeuten. Je nach der zugesetzten Quantität hat man es in der Hand, das Ausmaß zu bestimmen, in dem sich die 2. Vergärungsform abspielt. Man kann also die Kurve des Acetaldehyds (und natürlich die davon abhängige des Glycerins) unterhalb oder oberhalb der Alkohollinie führen; niemals können sich die Bahnen schneiden, da das Verhältnis, in dem beide Gärungsvorgänge verwirklicht werden, eben von der Menge des Zusatzmittels beherrscht wird und weil dann die Korrelationen konstant bleiben. Die beiden Prozesse haben die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit (z. B. $K = 0,05$), und demgemäß nehmen die Kurven für die Menge gebildeten Acetaldehyds einerseits, des Alkohols andererseits, den einander entsprechenden logarithmischen Verlauf. Bei den nachträglich zwar ganz natürlich erscheinenden, aber ursprünglich doch nicht als selbstverständlich anzusprechenden Beziehungen war es angebracht, durch eine verschärfte analytische Durchprüfung alle diese Zusammenhänge außer jeden Zweifel zu stellen. Wir haben deshalb mehrere ausführliche Zeitversuche vorgenommen und durch Bestimmung sowohl des verschwundenen Zuckers als der entstandenen Umsetzungsprodukte die vollkommene Verknüpfung der verschiedenen Vergärungsformen miteinander in Zeitabschnitten nachgewiesen. Es kann — wie innerlich begründet ist — niemals eine der drei Vergärungsformen in ihrem Ablauf voraneilen; denn sie sind ja

[1]) C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. 98, 141. 1918.

Digitized by Google

nicht im innersten Wesen verschieden, sondern ihr gemeinsames Glied ist der Acetaldehyd, der reduziert als Alkohol bei der 1. Vergärungsform, festgelegt als Sulfitkomplex bei der 2. Vergärungsform, in Gestalt seiner Dismutationsprodukte bei der 3. Vergärungsform in Erscheinung tritt. Wie wir weiter unten zeigen, charakterisiert die Menge des Alkohols die 1., die Quantität des vorhandenen Acetaldehyds die 2., die Menge der Essigsäure (oder des Glycerins) die 3. Vergärungsart. Man kann sich also auf die Ermittelung der drei erwähnten typischen Verbindungen beschränken, um den Umfang jeder der drei Grundformen der Vergärung ohne weiteres zu erkennen. (S. 314 u. 322). Wir fanden unser früheres Ergebnis bestätigt, daß die Hauptmenge der Gärungserzeugnisse nach 48 Stunden zu etwa 90% vorliegt, und daß dann die Reaktion langsam zu Ende geht. Mit voller Schärfe ergab sich in allen Intervallen, daß die verbrauchte Zuckermenge in Form der Umsetzungsprodukte nach der 1. und 2. bzw. 3. Vergärungsart vorhanden ist, und daß diese Erzeugnisse stets in den von uns erkannten konstanten Verhältnissen stehen.

Bei diesen Bestimmungen hatten wir zunächst von einer Ermittelung der zugehörigen Kohlensäuremengen Abstand genommen, weil ihre analytische Feststellung unter den gegebenen Verhältnissen ziemlich kompliziert ist und man eine ganz klare Übersicht auch aus den übrigen Daten gewinnt. Da sich die Umsetzung nach der 1. Vergärungsform entsprechend der Gleichung $C_6H_{12}O_6 = 2\,C_2H_5 \cdot OH + 2\,CO_2\,(\alpha)$, die nach der 2. gemäß der Gleichung $C_6H_{12}O_6 = C_3H_8O_3 + CH_3 \cdot CHO + CO_2\ (\beta)$ vollzieht, so ist man imstande, aus dem Quantum eines jeglichen Reaktionsproduktes sowie der Menge des verbrauchten Zuckers die Bilanz aufzustellen. Beispielsweise gilt für die Gay-Lussacsche Gleichung (α) der einfache Ausdruck: Zucker = Alkohol + Kohlensäure; innerhalb dieser Umsetzungsform stehen CO_2 und $C_2H_5 \cdot OH$ immer in der Relation ihrer Molekulargewichte, also ist $CO_2 = \frac{44}{46}$ Alkohol. Für die zweite Art der Vergärung ergeben sich nachstehende Zusammenhänge: Da Glycerin (Mol.-Gew. 92), Acetaldehyd (Mol.-Gew. 44) und Kohlensäure (Mol.-Gew. 44) der Gleichung β zufolge in molekularem Verhältnis auftreten, so ist die Menge der dabei entwickelten Kohlensäure stets genau gleich

Digitized by Google

dem Aldehydbetrage, oder da dieser $\frac{44}{92}$ der Glycerinausbeute ausmacht, auch $\frac{44}{92}$ des Glycerinwertes.

Während bei der gewöhnlichen Zuckerspaltung die Kohlensäure fast vollkommen den Vorgängen der 1. Vergärungsform ihre Entstehung verdankt, stammt sie bei der Umsetzung in Gegenwart schwefligsaurer Salze aus zwei Prozessen (α und β).

Kennt man aber die Menge des verbrauchten Zuckers, so kann man sämtliche Gärungserzeugnisse als Äquivalente eines jeden beliebigen Gärungsproduktes, auch des Kohlendioxyds, ausdrücken.

Ersichtlich ist:

Alkohol = (Zucker — CO_2 der 1. Vergärungsform) — (Aldehyd + Glycerin + CO_2 der 2. Vergärungsform), oder

(wenn man Alkohol mit A, Zucker mit Z, Glycerin mit G, die Gesamt-CO_2 mit K, die CO_2 der 1. Vergärungsform mit k_1, die der 2. mit k_2 bezeichnet, ferner k_1 durch sein Alkoholäquivalent, sowie k_2 nebst Aldehyd durch Glycerinäquivalente ausdrückt)

$$A = (Z - \tfrac{44}{46} A) - (\tfrac{44}{92} G + G + \tfrac{44}{92} G)$$
$$A = Z - \tfrac{44}{46} A - \tfrac{180}{92} G$$
$$A = \tfrac{46}{90} (Z - \tfrac{180}{92} G).$$

Nach dieser Formel findet man z. B. den gebildeten Alkohol aus der Menge des umgesetzten Zuckers und dem Glycerinbetrage.

Ersetzt man alle Werte für die Ausdrücke der 2. Vergärungsform durch Äquivalente von k_2 und bedenkt, daß $k_2 = K - k_1$ ist, so ergibt sich:

$$A = (Z - \tfrac{44}{46} A) - (k_2 + \tfrac{92}{44} k_2 + k_2)$$
$$A = (Z - \tfrac{44}{46} A) - \tfrac{180}{44} k_2$$
$$A = (Z - \tfrac{44}{46} A) - \tfrac{180}{44} (K - \tfrac{44}{46} A)$$
$$A = \tfrac{46}{90} (\tfrac{180}{44} K - Z).$$

Diese Formel gestattet die Ableitung des Alkohols aus der Menge des Zuckers und der Gesamtkohlensäure.

Beim gewöhnlichen Gärakte entweicht alles gebildete Kohlendioxyd, bzw. kann jederzeit aus den wässerigen Lösungen ausgetrieben werden. Anders unter den experimentellen Bedingungen der 2. Vergärungsform. Hier wird das entstandene Kohlendioxyd

Digitized by Google

nur zu einem Teile frei, während ein beträchtlicher Rest als Natriumbicarbonat in den Maischen zurückbleibt. Vollzieht sich doch die Umsetzung in diesem Falle, wenn man die Beteiligung des Sulfits berücksichtigt, nach der Formel:

$$C_6H_{12}O_6 + Na_2SO_3 + H_2O = CH_3 \cdot CH(OH) \cdot O\,SO_2Na$$
$$+ C_3H_8O_3 + NaHCO_3.$$

Die Ermittelung der gesamten Kohlensäure sowie die Aufstellung einer exakten Bilanz für die 2. Vergärungsform kommt also heraus auf eine direkte Bestimmung von Kohlendioxyd neben schwefliger Säure. Sie wird nun dadurch verwickelter, daß die schweflige Säure nicht nur in Gestalt des zugefügten anorganischen Salzes, sondern auch als Aldehyd-Sulfit-Complex im Gärgute zugegen ist. Zerlegt man beispielsweise durch Kochen mit Säure das in der Maische vorhandene Bicarbonat, so wird gleichzeitig anwesendes schwefligsaures Salz zersetzt und auch das Acetaldehyd-Sulfitderivat gespalten. Mit den übergetriebenen Gasmengen entweicht Aldehyd; er muß in geeigneter Weise absorbiert werden, weil er sonst mit der schwefligen Säure im Destillat sehr schnell wieder zu einer organischen Verbindung zusammentritt und störend wirkt.

Die Bestimmung von Kohlensäure neben schwefliger Säure kann nach verschiedenen Grundsätzen erfolgen, z. B. gravimetrisch durch Absorption in Lauge und Feststellung der vorhandenen Sulfitmenge aus der Schwefelanalyse, oder titrimetrisch durch Einleiten in Barytwasser, indem man von der verbrauchten Menge Baryumhydroxyd die aus dem Schwefelgehalt der Vorlage leicht abzuleitende Menge der schwefligen Säure in Abzug bringt. In beiden Fällen aber hat sich die vorherige vollständige Entfernung des Acetaldehyds als erforderlich erwiesen. Denn bei Auffangung in Ätzalkalien wird Aldehyd mit absorbiert und in schlecht definierte Aldehydharzprodukte übergeführt, für deren Analyse keine quantitativen Methoden zur Verfügung stehen. Bei der Titration mit Barytwasser kann sich unter Umständen infolge der Wiedervereinigung von Acetaldehyd und Sulfit im Destillat der Titer nicht entsprechend der Schwefligsäuremenge, sondern in geringerem Maße ändern, weil im Gegensatze zur zweibasischen schwefligen Säure die acetaldehyd-schweflige Säure einbasisch fungiert. Nach den Veröffentlichungen unserer verschiedenen vor-

Digitized by Google

erwähnten Mitteilungen über den qualitativen und quantitativen Verlauf der einzelnen Gärungsformen des Zuckers sind von anderer Stelle Untersuchungen bekanntgegeben worden, die vornehmlich eine technische Seite dieses Problems, die Ausnutzung der gesteigerten Glycerinausbeute, verfolgen. Hierin sind zwar auch Kohlensäuredaten angeführt aber es fehlt jede Angabe, auf welche Weise diese Zahlen ermittelt sind, sowie der Hinweis, wie die von uns beschriebene Bildung von Natriumbicarbonat im Gärgut Berücksichtigung gefunden hat und dem soeben erwähnten Einflusse des Acetaldehyds sowie von SO_2 Rechnung getragen ist. Wir geben eine Beschreibung unserer Methodik im experimentellen Teil und beschränken uns hier auf die Feststellung, daß tatsächlich genau jene Kohlensäuremenge entsteht, die beim gemeinsamen Ablauf der 1. und 2. Vergärungsform auftreten muß. Damit ist von neuem unsere frühere Schlußfolgerung bestätigt worden, daß die Erzeugnisse dieser beiden Umsetzungen die allein in Betracht kommenden Reaktionsprodukte sind.

Wir benutzen die Gelegenheit, darauf hinzuweisen, daß Neuberg und Färber (l. c. 1916) als erste das Vorkommen von Trimethylenglykol bei der Vergärung von Zucker in alkalischen Lösungen beschrieben haben, daß aber diese Substanz nach unseren späteren Erfahrungen[1]) kaum als ein ursprüngliches Erzeugnis der Kohlenhydratspaltung gelten konnte, indem es seine Entstehung den in den Maischen nachträglich einsetzenden, vermutlich von Mikroorganismen ausgelösten Vorgängen verdankt. Dieses Auftreten des 1,3-Dioxypropans entspricht also ganz der längst bekannten Bildung in Seifenunterlaugen (A. Freund, 1881), wo es von Bakterien sekundär aus dem vorhandenen Glycerin hervorgebracht wird. Verschiedene Erreger, die Glycerin in Trimethylenglykol umwandeln, sind offenbar weit verbreitet; sie finden sich beispielsweise im Leitungswasser vor, und es kann demnach nicht wundernehmen, daß beim Stehen verdünnter Glycerinlösungen Dioxypropan auch von anderen als Begleiter des Glycerins beobachtet worden ist[2]). Wir haben uns aber in mehrfachen Versuchen davon überzeugt, daß es weder bei der Vergärung des Zuckers in Gegenwart von schwefligsauren Salzen noch von

[1]) C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 92, 234. 1918.

[2]) Henkel, Seifenfabrikant 36, 769. 1918; Solvay, Seifensiederztg. 45, 459 u. 595. 1918; Rojahn, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 52, 1454. 1919.

Digitized by Google

Natriumbicarbonat primär auftritt. Analysiert man das Gärgut, nachdem es innerhalb 3—4 Tagen mit Reinzuchthefe ausgegoren ist, so findet man keine Spur Trimethylenglykol. Die Verhältnisse liegen also hier anders, als bei den technischen Analysen wo die Bestimmung des Glycerins naturgemäß nach längerer Aufbewahrung ausgeführt wird. Deshalb haben auch die Ermittelungen des Glycerins nach der bewährten Methode von Zeisel-Fanto-Stritar[1]) volle Beweiskraft, wenn sie, wie bei wissenschaftlichen Versuchen, alsbald nach Beendigung der Gärung vorgenommen werden.

Die Methodik der Zuckerbestimmung erfordert in diesen Fällen eine besondere Anpassung. Sie kann leider nicht polarimetrisch geschehen, da unter der Einwirkung des vorhandenen Sulfits die nachstehend beschriebenen Drehungsänderungen eintreten. Es muß daher eine titrimetrische Ermittelung Platz greifen. Bei dieser hat man auf folgende Punkte bedacht zu sein: Einmal muß der Aldehyd entfernt werden, da er — wenigstens auf Fehlingsche Lösung — reduzierend wirkt; ferner muß man mit dem Umstande rechnen, daß infolge der alkalischen Reaktion der angewendete Trauben- und Fruchtzucker eine Umlagerung ineinander erfahren, bzw. daß auch etwas Mannose entsteht, die alle einen verschiedenen Reduktionswert haben. Entsprechende Verschiebungen können natürlich bei Verwendung von Rohrzucker ebenfalls auftreten, da er ja schnell invertiert wird. Das Reduktionsvermögen der drei in Betracht zu ziehenden Hexosen ist nun gegenüber Fehlingscher Lösung nicht so verschieden, daß eine Bestimmung damit sehr fehlerhaft wäre. Vor der Zuckertitration muß die vorhandene Acetaldehyd-Natriumbisulfitverbindung in der (S. 324) angegebenen Art beseitigt werden. Der Fruchtzucker ändert sich übrigens unter diesem Einflusse des Sulfits am wenigsten, so daß wir bei Verwendung von Fructose auch Versuche durchgeführt haben, bei denen die Zuckerabnahme polarimetrisch verfolgt worden ist.

Im Hinblick auf die eben erörterte Möglichkeit, daß in der alkalischen Umgebung Mannose entsteht, haben wir das Abfangverfahren auch auf diesen Zucker angewendet und konstatiert, daß die 2. Vergärungsform hier ebenfalls einsetzt. Damit zeigte sich, daß die 3 Zymohexosen wie der gewöhnlichen

[1]) Zeisel-Fanto-Stritar, Z. f. analyt. Ch. 43, 292, 1904.

Digitized by Google

alkoholischen Gärung, so auch der Acetaldehyd-Glycerin-Spaltung in gleicher Weise fähig sind. Ergänzend haben wir weiterhin zwei höhere Saccharide geprüft. Es ergab sich bemerkenswerterweise, daß die Maltose in Gegenwart von Dinatriumsulfit nicht vergärbar ist, offenbar, weil die Maltase bei der falschen, vom se undären schwefligsauren Alkalisalz verursachten H-Ionenkonzentration nicht wirkt. Vermindert man die alkalische Reaktion, indem man an Stelle des Dinatriumsulfits Calciumsulfit[1]) verwendet, so tritt erhebliche Aldehydbildung auch mit Maltose ein. Ebenso war bei Entstehung von Aldehyd aus dem Trisaccharid Raffinose nachweisbar. Wir haben nicht untersucht, ob dabei die Melibiase tätig bleibt; aber für die Invertase, die ja aus der Raffinose Fructose in Freiheit setzt, haben wir schon früher die Toleranz gegenüber alkalischem Sulfit mehrfach betont, und wir haben ferner dargetan, daß der Fruchtzucker nach der 2. Vergärungsform glatt zerlegbar ist.

Die Rolle, die den schwefligsauren Salzen bei der Herbeiführung der Acetaldehyd-Glycerin-Spaltung des Zuckers zukommt, haben wir bereits in den ersten Mitteilungen über diesen Gegenstand geschildert. Sie wirken als Abfangmittel für den als Zwischenprodukt zu betrachtenden Acetaldehyd. Indem sie ihn festlegen, machen sie den „Gärungswasserstoff" für die biologische Reduktionsleistung verfügbar, die das Glycerin liefert. Wir zeigen noch besonders, daß an dieser Hydrierung als solcher die Sulfite sich nicht beteiligen (s. S. 321).

Weiterhin haben wir auch **Zeitversuche über den Verlauf der 3. Vergärungsform** angestellt sowie 5 lückenlose **Bilanzen derselben** durchgeführt; dabei gelangten verschiedene Alkalisatoren, wie Natriumhydrocarbonat und Dikaliumphosphat, in wechselnden Konzentrationen zur Verwendung.

Was zunächst den Zeitversuch betrifft, den wir für eine Vergärung in Gegenwart von Natriumbicarbonat beschreiben, so ergaben sich Verhältnisse, die den Erscheinungen bei der 2. Vergärungsform ähneln. Während aber bei der Sulfitgärung der in der Zeiteinheit auftretende Alkohol ein Maß des lediglich nach der 1. Vergärungsform zerfallenen Zuckers ist, addiert sich

[1]) Vgl. C. Neuberg, Zeitschr. f. Botanik **1918** sowie C. Neuberg und E. Reinfurth, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **52**, 1684. 1919.

Digitized by Google

in Anwesenheit alkalischer Salze zu jenem Quantum noch die Menge Weingeist, welche durch *Dismutation*[1]) des Zwischenproduktes Acetaldehyd nach der 3. Vergärungsart entsteht. Der Verlauf der letzteren ergibt sich aus der Glycerinkurve. Wir kennzeichnen die 3. Vergärungsform am besten durch die Glycerinmenge, da ihre Ermittelung analytisch schärfer ist als die Essigsäurebestimmung, und zwar deshalb, weil anfangs, bei noch reichlicherem Zuckergehalt, die Zerlegung des Acetats durch Destillation mittels einer stärkeren Säure leicht von einer Bildung unspezifischer flüchtiger Säuren (aus zersetztem Zucker) begleitet ist. Nach der angeführten Gleichung der 3. Vergärungsform beträgt die Menge des durch Dismutation entstandenen Sprits 1 Mol. Alkohol auf 2 Mol. Glycerin, also 46 $C_2H_5 \cdot OH$ auf 184 $C_3H_8O_3$ = genau $^1/_4$ der zugehörigen Glycerinausbeute. Den sinnfälligen Ausdruck für die Beziehungen beider Vergärungsformen zueinander gewinnt man durch den Entwurf einer Kurve, die den Verlauf rein nach der 1. Vergärungsform dadurch wiedergibt, daß von der Gesamtalkoholmenge die Quantität des Dismutationssprits (= $^1/_4$ des jeweiligen Glycerinbetrages) abgesetzt ist. Diese Kurve führen wir (s. S. 334) in punktierter Form an. Damit gelangt man zu der Einsicht, daß analog unseren Darlegungen für die Gärung in Gegenwart von schwefligsauren Salzen auch die in Anwesenheit von Alkalisatoren nach der 1. und 3. Vergärungsart sich abspielenden Umsetzungen in konstanter Relation stehen, die sich in dem logarithmischen Verlauf der Bahnen ausdrückt[2]).

Hierbei wie in den *Bilanzversuchen für die 3. Vergärungsform* trat wiederum die Bedeutung folgender beiden Punkte hervor, auf die wir schon in einer unserer früheren[3]) Mitteilungen über die Gärungen mit lebenden Hefen in alkalischer Umgebung hingewiesen hatten.

1. Wegen der physiologischen Einwirkung der basischen Zusatzmittel auf den Hefeorganismus läßt sich deren Anwendung nicht

---

[1]) $2\,C_6H_{12}O_6 = 2\,C_3H_8O_3 + 2\,CO_2 + 2\,CH_3 \cdot CHO$

$$CH_3 \cdot CHO \xrightarrow{+\,H_2O} CH_3 \cdot COOH + C_2H_5 \cdot OH\,.$$

[2]) Die geringe absolute Menge der Gärprodukte zu Beginn der Umsetzungen bedingt natürlich eine gewisse Ungenauigkeit der Anfangswerte.

[3]) C. *Neuberg* und J. *Hirsch*, diese Zeitschr. 96, 175. 1918.

Digitized by Google

beliebig steigern. Die Toleranz liegt bei einer Menge, welche keine völlige Zurückdrängung der 1. Vergärungsform herbeiführt, sondern eine Umsetzung nach der 3. Vergärungsart nur bis zu 35,4% gestattete. (Das ist nebenbei gesagt rund die Hälfte des Umfanges, in dem die 2. Vergärungsmöglichkeit bisher verwirklicht worden ist.) Demgemäß läuft nebenher immer die 1. Vergärungsform ab.

2. Der Zucker wird ganz oder angenähert vollständig verbraucht, jedoch wird nicht die volle Kohlenhydratmenge in Gestalt von Produkten der 3. Vergärungsform wiedergefunden. Der bisher unaufgeklärte Verlust[1]) ist zwar zumeist nicht groß, schwankt aber bei den verschiedenen Versuchsanordnungen zwischen 3,5 und 15,7%. Es bleibt zunächst dahingestellt, worauf dieses Manko beruht, d. h. ob es sich um eine gesteigerte Verwendung des Zuckers für allgemeine Stoffwechselvorgänge handelt oder um die Bildung eines nicht reduzierenden und nicht vergärbaren Kondensationsproduktes oder um die Entstehung von Milchsäure. Dieses Defizit scheint einer gesetzmäßigen Beeinflussung durch die Konzentration des verwendeten Zusatzmittels sowie auch durch dessen chemischen Charakter zu unterliegen[2]). Diese Verhältnisse werden durch folgende Übersicht veranschaulicht (s. S. 321):

Freilich sind die zusammengestellten Versuche nicht völlig mit einander vergleichbar. Sie sind zwar alle mit derselben obergärigen Hefe (Rasse M des Berliner Institutes für Gärungsgewerbe) ausgeführt, aber zu verschiedenen Zeiten, innerhalb deren der Zustand der Hefe Schwankungen unterlag; auch stimmte die Versuchstemperatur nicht durchgängig überein. Immerhin tritt zutage, daß mit sinkender Alkalisatormenge die Vergärung sich einer 100%igen Umsetzung nähert, und das in vollkommenerem Maße bei der Anwendung von Natriumbicarbonat als von sekundärem phosphorsaurem Kalium.

Die in Essigsäure, Glycerin, Äthylalkohol und Kohlensäure einerseits (nach der 3. Vergärungsform), und in Kohlensäure und

[1]) Dieser Verlust an Zucker, der nach Pasteur selbst bei gewöhnlicher Gärung 6% beträgt, kann nach L. Lindet (Chem. Centralblatt 17, II, 109 unter besonderen Verhältnissen, die sich mit unseren Versuchsbedingungen vergleichen lassen, sogar bis auf 17,5% steigen.

[2]) Eine Mitwirkung von Mikroorganismen ist einstweilen nicht erwiesen, aber erst durch Verwendung absoluter Hefereinkulturen sicher auszuschließen. Gering dürfte der unmittelbare zuckerstörende Einfluß der OH-Ionen (nach Murschhauser) zu veranschlagen sein.

Digitized by Google

Alkohol andererseits (nach der 1. Vergärungsform) zerfallene Zuckermenge findet man bilanzmäßig (vgl. S. 323) in vollkommener Übereinstimmung mit den Umsetzungen gemäß den zusammengefaßten Gleichungen:

α) $C_6H_{12}O_6 = 2\,C_2H_5 \cdot OH + 2\,CO_2$ und

γ) $2\,C_6H_{12}O_6 + H_2O = 2\,C_3H_8O_3 + 2\,CO_2 + C_2H_5 \cdot OH + CH_3 \cdot COOH$.

Tabelle I.

Für 100 ccm ausgegorene Maische, enthaltend 10 g Rohrzucker = 10,5 g Hexosen, stellten wir fest bei:

	Bilanzversuch 1	Bilanzversuch 2	Bilanzversuch 3	Bilanzversuch 4	Bilanzversuch 5
Alkalisator	$NaHCO_3$		K_2HPO_4		
Konzentration	0,6 m	0,9 m	0,5 m	0,75 m	1,0 m
Summe d. Gärprodukte	10,28 g	9,72 g	9,62 g	9,16 g	9,01 g
$-H_2O$ der Dismutationsreaktion	−0,12 g	−0,14 g	−0,14 g	−0,13 g	−0,13 g
Durch Gärung umgesetzten Zucker	10,16 g	9,58 g	9,48 g	9,03 g	8,88 g
Gärungserzeugnisse in Prozenten des angewendeten Zuckers	96,5 %	91,0 %	90,0 %	85,8 %	84,3 %

Für die rechnerischen Kontrollen liegen die Verhältnisse komplizierter als bei der Sulfitgärung, indem die beiden Produkte der 1. Vergärungsform zugleich auch solche der 3. sind, so daß dementsprechend kein unmittelbares Analysenergebnis den Umsatz rein nach der Gay-Lussacschen Gleichung ausdrückt. Wie wir bei der Schilderung des Zeitversuches bereits gesehen haben, steht die nach der 3. Vergärungsform durch Dismutation gebildete Spritmenge in einer einfachen Beziehung zur Glycerinausbeute[1]), und zwar ist das Verhältnis gleich dem Quotienten 1 Mol. Äthylalkohol : 2 Mol. Glycerin = 46 : 184 = 1 : 4. Man findet also die Alkoholmenge des nach der 1. Vergärungsform zerlegten Zuckers gleich der Differenz: Gesamtalkohol — ¼ des Glycerins.

Eine entsprechende Überlegung führt, da nach der Gleichung γ auf 2 Mol. Glycerin 2 Mol. CO_2 entstehen, für die Kohlensäure der 1. Vergärungsform zu dem Ausdruck = Gesamt-

[1]) Natürlich ist auch eine Relation zur Essigsäure vorhanden; da deren Ermittelung jedoch weniger genau ist, so benutzen wir die Beziehung zum Glycerin, zumal sie auch zufällig rechnerisch bequemere Zahlen liefert.

Digitized by Google

kohlensäure — $\frac{44}{92}$ Glycerin. Aus den Zahlen für Alkohol bzw. Kohlensäure und Glycerin kann man also den Umsatz nach der 1. Vergärungsform ableiten, während die Daten für Glycerin oder Essigsäure ohne weiteres die Spaltung nach der 3. Vergärungsform anzeigen. Es ist die Menge des Zuckers, die durch Ablauf der 1. Vergärungsform verschwindet:

$$z_1 = (A - \tfrac{1}{4}\,G) + (K - \tfrac{44}{92}\,G)\,.$$

(In dieser Formel bedeutet A = Gesamtalkohol, K = Gesamtkohlensäure, G = Glycerin.) Entsprechend findet man die nach der 3. Vergärungsform umgesetzte Zuckermenge (z_3). Hierbei ist noch zu berücksichtigen, daß auf 2 Mol. Zucker 1 Mol. Wasser aufgenommen wird, und zwar infolge Verbrauchs durch die zugrunde liegende Dismutation des Acetaldehyds; da nach obiger Gleichung γ auf 1 Mol. Essigsäure oder 2 Mol. Glycerin 1 Mol. Wasser gebunden wird, so ergibt sich die Menge des Wassers = dem Quotienten 18/60 Essigsäure bzw. 18/184 Glycerin, und es ist

$$z_3 + \tfrac{18}{184}\,G = G + \tfrac{44}{92}\,G + E + \tfrac{1}{4}\,G\,.$$

(In dieser Formel bedeutet G = Glycerin und E = Essigsäure). Die vergorene Gesamtzuckermenge (Z) beträgt demgemäß nach Addition von z_1 und z_3:

$$Z + \tfrac{18}{184}\,G = (A - \tfrac{1}{4}\,G) + (K - \tfrac{44}{92}\,G) + G + \tfrac{44}{92}\,G + E + \tfrac{1}{4}\,G.$$

Da die nach der 1. Vergärungsform gebildeten Produkte Alkohol ($A - \frac{1}{4}\,G$) und Kohlensäure ($K - \frac{44}{92}\,G$) sich in ihren Mengen wie 46 : 44 verhalten und die nach der 3. Vergärungsform auftretenden Erzeugnisse Glycerin (G) und Essigsäure (E) in der Relation von 92 : 30 stehen, so genügen 2 Angaben, von denen die eine auf ein Produkt der 3. Vergärungsform (Glycerin oder Essigsäure) entfallen und die andere ein auch der 1. Vergärungsform angehörendes (Alkohol oder Kohlensäure) betreffen muß, um in jedem Augenblicke des Gäraktes die Bilanz zu ziehen.

Man gelangt auf die angegebene Weise zu folgenden Formeln:

1. $Z + \frac{18}{184}\,G = (A - \frac{1}{4}\,G) + \frac{44}{46}(A - \frac{1}{4}\,G) + G + \frac{44}{92}\,G$, d. h.
$+ \frac{30}{92}\,G + \frac{1}{4}\,G$

$$Z = \frac{180\,A + 135\,G}{92}$$

(Z ausgedrückt durch Alkohol und Glycerin.)

2. Analog läßt sich ableiten, da $G = \frac{92}{30}\,E$ ist:

$$Z = \tfrac{180}{92}\,A + \tfrac{135}{30}\,E\,.$$

(Z ausgedrückt durch Alkohol und Essigsäure.)

$$3.\ Z + \tfrac{18}{184} G = \tfrac{46}{44}\left(K - \tfrac{44}{92} G\right) + \left(K - \tfrac{44}{92} G\right) + G + \tfrac{44}{92} G + \tfrac{30}{92} G + \tfrac{1}{4} G,$$

oder $$Z = 90\left(\frac{K}{44} + \frac{G}{92}\right)$$

(**Z ausgedrückt durch CO_2 und Glycerin**), und

$$4.\ Z = 90\left(\frac{K}{44} + \frac{E}{30}\right).$$

(**Z ausgedrückt durch CO_2 und Essigsäure.**)

Wir haben für die Aufstellung der Bilanzen sämtliche Gärungsprodukte quantitativ bestimmt, die bei dem gemeinsamen Ablaufe der 1. und 3. Vergärungsform bisher aufgefunden sind; daneben haben wir eine Berechnung derselben angestellt. Mit welcher Präzision sich innerhalb der einzelben Vergärungsformen der Umsatz vollzieht, wird offenbar, wenn man neben die analytisch ermittelten Daten die nach obigen Formeln sich ergebenden Werte setzt.

Ergebnis von 5 verschiedenen Bilanzversuchen:

Tabelle II.

Gärungsendprodukte aus 100 ccm Gärgut, enthaltend 10 g Rohrzucker = 10,5 g Hexosen.

	Bilanzvers. 1		Bilanzvers. 2		Bilanzvers. 3		Bilanzvers. 4		Bilanzvers. 5	
Zusatz	$NaHCO_3$ = 0,6 m		$NaHCO_3$ = 0,9 m		K_2HPO_4 = 0,5 m		K_2HPO_4 = 0,75 m		K_2HPO_4 = 1,0 m	
Gärungsendprodukte	gefunden g	berechn.[1] aus Alkoh. u. Zucker g	gefunden g	berechn.[1] aus Alkoh. u. Zucker g	gefunden g	berechn.[1] aus Alkoh. u. Zucker g	gefunden g	berechn.[1] aus Alkoh. u. Zucker g	gefunden g	berechn.[1] aus Alkoh. u. Zucker g
Alkohol . . .	4,30		3,78		3,78		3,58		3,47	
Kohlensäure .	4,43	4,40	4,06	3,97	3,96	3,94	3,84	3,76	3,73	3,66
Glycerin . . .	1,18	1,19	1,42	1,48	1,43	1,42	1,31	1,38	1,35	1,42
Essigsäure . .	0,37	0,39	0,46	0,48	0,45	0,46	0,43	0,45	0,46	0,46
zusammen . .	10,28		9,72		9,62		9,16		9,01	
Abzuziehen ist das Wasser der Dismutationsreaktion: $H_2O = \frac{9}{92}$ Glycer.	-0,12		-0,14		-0,14		-0,13		-0,13	
Vergor. Zucker	10,16		9,58		9,48		9,03		8,88	

[1]) **Berechnet nach den Ausdrücken:**

Kohlensäure $= \frac{22}{135}\left(Z + \frac{90}{23} A\right)$ (abgeleitet aus obigen Formeln 1 und 3),

Glycerin $= \dfrac{92\,Z - 180\,A}{135}$ (abgeleitet aus Formel 1),

Essigsäure $= \frac{2}{3}\left(Z - \frac{90}{46} A\right)$ (abgeleitet aus Formel 2).

Digitized by Google

Die Übereinstimmungen dürfen als ganz ausgezeichnet gelten.
Die vorstehenden Ausführungen belegen wir durch folgende

Auszüge aus den Protokollen:

1. Der Zusammenhang der 1. und 2. Vergärungsform gemäß dem zeitlichen Ablauf der Umsetzungen.

Je nach der Menge des Abfangmittels kann man, wie in unseren ersten Mitteilungen über diesen Gegenstand gezeigt ist, den Eintritt der 2. Vergärun form in starkem oder minderem Grade veranlassen. Wir beschreiben ausführlicher einen Versuch, den wir wie gewöhnlich mit einer 10proz. Lösung von Zucker angestellt haben bei Anwendung von 120% seines Gewichtes an sekundärem schwefligsauren Natrium. Die Hefemenge wurde dem Zuckerquantum gleich gewählt. Weil auch Zuckeranalysen vorgenommen wurden, gingen wir von Invertzucker aus und nicht, wie zumeist, von Rohrzucker; wie wir früher wiederholt hervorgehoben haben, bewirkt zwar die Invertase in den alkalischen Lösungen vollständige Hydrolyse der Saccharose, aber über den Gang der Inversion ist nichts bekannt. Wir verfuhren folgendermaßen:

750 Rohrzucker in 3700 ccm Wasser wurden mit 75 ccm 2n-Schwefelsäure in üblicher Weise invertiert. Die mit 75 ccm 2n-Natronlauge neutralisierte Lösung wurde mit 7,5 g Ammoniumsulfat, 7,5 g Dinatriumphosphat, Spuren Chlorkalium, Magnesiumsulfat sowie Chlorcalcium und dann mit einer konz. Lösung von 900 g Dinatriumsulfit (100%iges Salz) nebst 750 g Oberhefe M unter Herstellung eines Gesamtvolumens von 7500 ccm versetzt. Die Vergärung geschah bei 36°. Nach 8, 16, 24, 32, 40, 48, 168 sowie 222 Stunden wurden Bestimmungen von Alkohol, Acetaldehyd und reduzierendem Zucker vorgenommen. Die Alkoholanalyse erfolgte nach den Angaben von Neuberg und Hirsch, gemäß denen durch Digestion und Destillation des Rohsprits über m-Phenylendiaminchlorhydrat der beigemengte Acetaldehyd beseitigt wird. Den Acetaldehyd ermittelten wir nach dem Destillations-Titrations-Verfahren von Neuberg und Reinfurth. Die quantitative Bestimmung des reduzierenden Zuckers erforderte einige vorbereitende Maßnahmen. Polarisation ist aus den früher dargelegten Gründen unmöglich. Die Titration wird durch die Gegenwart des gleichzeitig anwesenden Acetaldehyds vereitelt; sie kann aber in dem Rückstande ausgeführt werden, der bei der Aldehydanalyse hinterbleibt. Diese Lösung ist so beschaffen, daß das Gärgut mit Chlorbarium von löslichem Sulfat, ungebundenem Sulfit sowie Carbonat befreit ist. Durch Destillation mit kohlensaurem Barium wird dann das vorhandene Acetaldehyd-Sulfit zerlegt. Man gewinnt so eine Flüssigkeit, die außer Zucker kleine Mengen Erdalkaliverbindungen enthält; diese können durch

Digitized by Google

Zusatz von etwas Glaubersalz entfernt werden. Die auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllte Lösung wurde klar filtriert und mit einem Tropfen Eisessig schwach angesäuert. Zur Titration wurde ein ungefährer Gehalt von 1% Zucker hergestellt. Die bei der Titration erhaltenen Daten sind alle für Traubenzucker in Ansatz gebracht. Dies kann im vorliegenden Falle ohne großen Fehler geschehen, da das Reduktionsvermögen der Lävulose und der evtl. vorhandenen Mannose sich nicht allzusehr nach oben und unten von dem Reduktionswerte der Glucose entfernt. Weiter ist zu bemerken, daß bei dem hohen Sulfitgehalt der Versuch erst nach erneuter Hefenzugabe zu Ende ging, die nach 96 Stunden erfolgte. Durch die damit verbundene Abkühlung und Volumveränderung wurden kleine Unregelmäßigkeiten verursacht, so daß wir auf eine Bestimmung zwischen dem 3. und 7. Tag verzichteten. Nach 1 Woche war trotz der sehr reichlichen Anwendung schwefligsauren Salzes praktisch aller Zucker nahezu umgesetzt; die Konstanz der Endwerte wurde noch durch eine Kontrolle nach 9 Tagen bestätigt.

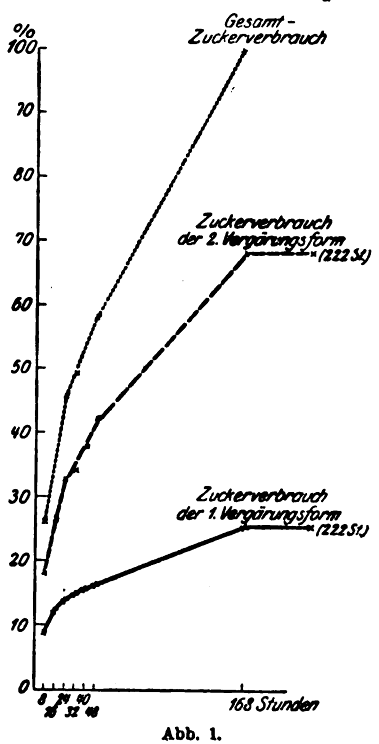


Abb. 1.

Die ermittelten Zahlen sind in der Abb. 1 graphisch wiedergegeben und in der folgenden Tabelle vereint:

Tabelle III.

In 100 ccm Gärgut mit einem Gehalt von 10 g Rohrzucker = 10,5 g Hexosen sind gefunden:

Nach Stunden	Alkohol g	Aldehyd g	Umgesetzter Zucker d. 1. Verg.-Form g = %	Umgesetzter Zucker d. 2. Verg.-Form g = %	Zusammen %	Vergoren. Zucker gemäß der durch Titration erhalten. Werte %
8	0,47	0,46	0,92 = 8,7	1,88 = 17,9	26,6	25,7
16	0,67	0,67	1,31 = 12,4	2,74 = 26,0	38,4	—
24	0,74	0,84	1,45 = 13,8	3,44 = 32,6	46,4	45,8
32	0,79	0,87	1,55 = 14,7	3,56 = 33,8	48,5	48,9
40	0,84	0,97	1,64 = 15,6	3,97 = 37,6	53,2	—
48	0,87	1,09	1,70 = 16,2	4,46 = 42,3	58,5	58,2
168	1,38	1,74	2,70 = 25,6	7,12 = 67,6	93,2	—
222	1,38	1,75	2,70 = 25,6	7,12 = 67,6	93,2	—

Digitized by Google

Dieser Übersichtstafel entnimmt man, daß die Menge des Aldehyds dauernd die des Alkohols übersteigt. Die Form der Kurven, welche den Zuckerverbrauch durch die einzelnen Vergärungsformen gemäß den analytisch gefundenen Zunahmen von Aldehyd und Alkohol einerseits, den durch Titration ermittelten Gesamtverbrauch an Zucker andererseits veranschaulichen, zeigen den einander entsprechenden Verlauf.

Da der Ertrag an Weingeist den Zerfall nach der 1. Vergärungsform, die Ausbeute an Acetaldehyd den Abbau nach der 2. Vergärungsform den Gleichungen

$$\alpha)\ C_6H_{12}O_6 = 2\,C_2H_5\cdot OH + 2\,CO_2 \quad \text{und}$$
$$\beta)\ C_6H_{12}O_6 = CH_3\cdot CHO + CO_2 + C_3H_8O_3$$

zufolge offenbart, so weiß man damit, wieviel Zucker in jedem Zeitabschnitte umgesetzt sein mußte. Wir stellen die so sich ergebenden Zahlen neben die titrimeterisch gefundene Zuckerwerte und bemerken eine Übereinstimmung, die als überaus weitgehend gelten muß, wenn man bedenkt, daß ja gerade die direkte Ermittelung des Zuckers im vorliegenden Falle die am wenigsten scharfen Daten liefert.

Ferner ergibt sich dieser Zusammenhang auch in den Versuchen mit Fructose, wo wir (vgl. S. 317) eine angenäherte polarimetrische Zuckeranalyse vornehmen durften[1]).

Beispiel: 270 ccm einer 20,66 proz. Lävuloselösung wurden unter Zusatz von 30 g Hefe M und 54 g konz. gelöstem Dinatriumsulfit (von 100%) samt den üblichen Nährsalzen auf ein Gesamtvolumen von 540 ccm ge-

[1]) Über die Änderungen, die im Drehungsvermögen von Trauben- und Fruchtzuckerlösungen unter dem Einflusse von Dinatriumsulfit eintreten, gibt folgende kleine Zusammenstellung Auskunft.

a) Mischung gleicher Teile einer 19,8 proz. nicht mehr mutarotierenden Glucoselösung und einer 20 proz. Dinatriumsulfitlösung.

Ablesung im 1-dcm-Rohr im Prozente Traubenzucker anzeigenden Präzisionsapparat von Neuberg (diese Zeitschr. 67, 102. 1914):

sofort	+ 4,90
nach 1 Tage	+ 3,85
„ 2 Tagen	+ 3,20
„ 3 „	+ 2,85
„ 4 „	+ 2,40
„ 9 „	+ 0,90.

b) Mischung gleicher Teile einer 9,9 proz. Glucoselösung und einer 10 proz. Dinatriumsulfitlösung.

Digitized by Google

bracht. Der Fruchtzuckergehalt der Mischung betrug also 10,33%. Nach 24 Stunden erfolgte die erste Aldehydbestimmung; sie ergab 10,41% vom Gewichte des eingemaischten Zuckers. Eine gleichzeitig ausgeführte Polarisation, für die man durch Fällung von 10 ccm des Gärguts mit 10 ccm einer verdünnten Lösung von kolloidalem Eisenhydroxyd (5 ccm von Ferrum oxydatum dialysatum, 5%igen auf 20 ccm verdünnt) und Filtration eine wasserklare Lösung bereitet, zeigte einen Gehalt von 4,11% Lävulose im Gärgut an; 60,22% des angewendeten Zuckers waren also bereits vergoren. Legt man den gefundenen Aldehydwert der Berechnung einer Bilanz für die 2. Vergärungsform zugrunde, so mußten außerdem entstanden sein: 10,41%

Ablesung im 1-dcm-Rohr:

sofort	+ 2,50
nach 1 Tage	+ 1,95
„ 2 Tage	+ 1,60
„ 3 „	+ 1,45
„ 4 „	+ 1,15
„ 9 „	+ 0,50.

c) Mischung gleicher Teile einer 24 Stunden alten ca. 10%igen Lävuloselösung und einer 20proz. Dinatriumsulfitlösung.

Ablesung im $^1/_2$-dcm-Rohr:

sofort	— 4,65
nach 1 Tage	— 4,45
„ 2 Tagen	— 4,00
„ 3 „	— 3,75
„ 4 „	— 3,50
„ 9 „	— 2,70.

d) Mischung gleicher Teile einer etwa 5%igen Lävuloselösung und einer 10%igen Dinatriumsulfitlösung.

Ablesung im 1-dcm-Rohr:

sofort	— 4,45
nach 1 Tage	— 4,25
„ 2 Tagen	— 4,00
„ 3 „	— 3,85
„ 4 „	— 3,60
„ 9 „	— 2,90.

Man sieht daraus, daß die Drehung der Glucose sich sehr erheblich ändert, während die Fructose innerhalb 48 Stunden nur eine Rotationsverminderung von etwa 10% erfährt. Selbst nach 9 Tagen ist beim Fruchtzucker die Drehung noch nicht auf die Hälfte zurückgegangen, während sie beim Traubenzucker etwa auf $^1/_5$ des Anfangswertes gesunken war; außer der Vereinigung mit Sulfit ist im letzten Falle eine teilweise Umwandlung in Lävulose gemäß dem Ausfall der Seliwanoffschen Reaktion nachzuweisen.

Digitized by Google

Kohlendioxyd[1]) und 21,75% Glycerin, im ganzen 42,57% Zuckerumwandlungsprodukte. Da nach der optischen Prüfung der Gesamtzuckerumsatz 60,22% betragen hatte, so entfallen auf den Abbau nach der 1. Vergärungsform 60,22 — 42,57 = 17,65% Zucker. Aus diesen könnten 9,02 g Alkohol im Höchstfalle hervorgegangen sein, während ein tatsächlicher Gehalt von 8,76% Alkohol ermittelt wurde. Nach 48 Stunden war polarimetrisch kein Zucker mehr nachzuweisen, und die Aldehydausbeute war auf 14,58% gestiegen.

2. Die Bilanz der 2. Vergärungsform.

Nach dem Ausfall der Bestimmungen von Alkohol einerseits, von Acetaldehyd und Glycerin andererseits sowie nach der Ermittelung des verschwundenen Zuckers konnte es keinem Zweifel mehr unterliegen, daß die Umsetzung gemäß der erwähnten, schon früher (1918) von uns begründeten Gleichung verläuft; obgleich auch weiterhin die Fahndung auf andere Reaktionshauptprodukte erfolglos geblieben ist, so haben wir uns zwecks Behebung jeglicher Ungewißheit doch der Mühe vollständiger Bilanzen unterzogen. Die Methoden der Bestimmung von Acetaldehyd, Glycerin und Alkohol nebeneinander haben wir (s. unsere früheren Mitteilungen) soweit ausgebildet, daß sie fast als Schnellverfahren Anwendung finden können. Anders liegen die Verhältnisse für das Kohlendioxyd (s. S. 315). Das einfachste Verfahren, das wir allein hier beschreiben wollen, beruht auf einer titrimetrischen Analyse von CO_2 und ist in nachstehend geschilderter Art ausgeführt.

Die Kohlensäure, die gebildet wird, setzt sich zusammen aus der frei entwickelten und der in der Maische gebundenen. Leitet man durch den Gäransatz von Beginn an einen indifferenten Gasstrom, z. B. Stickstoff oder Wasserstoff, so wird das abgegebene Kohlendioxyd kontinuierlich fortgeführt und von titriertem Barytwasser aufgefangen. Nach beendigter Gärung muß dann die als Bicarbonat anwesende Kohlensäure aus der sulfithaltigen Maische frei gemacht werden.

Zweckmäßig verwendet man für die Gasanalyse einen aliquoten Teil (50 ccm). Die 50 ccm befanden sich in einem Rundkolben, der einen dreifach durchbohrten Gummistopfen trug, im Innern eines Brutschrankes. Oben auf demselben war der Wasserstoff entwickelnde Kippsche Apparat nebst Waschflaschen (alkalische Pyrogallussäure und Silbernitratlösung) angeordnet sowie das System der Barytwasser enthaltenden Absorptions-

[1]) Die Mengen von Kohlendioxyd und Acetaldehyd sind bei der 2. Vergärungsform gleich.

Digitized by Google

gefäße. Von diesen wurden 4 Stück hintereinander geschaltet. Bei dem als Luftloch dienenden Tubus des Brutschrankes trat das Zuleitungsrohr für den Wasserstoff ein und stand mit dem Gärkölbchen durch die eine Bohrung des Gummistopfens in Verbindung. In der zweiten Bohrung saß ein Tropftrichter, während das dritte Loch das zu den Barytvorlagen führende Gasableitungsrohr trug. Wegen der nachträglich vorzunehmenden Zerlegung des gebildeten Bicarbonats im Rückstande mittels verdünnter Säure ist ein 500 ccm fassender Kolben zu wählen. Der Tropftrichter ist aus folgenden Gründen angebracht: Die Ausführung der Destillation mit Säure im Brutschrank selber ist unbequem. Man mußte daher den Gärkolben vorübergehend von seinen Kommunikationen mit dem Kippschen Apparat und den Absorptionsgefäßen trennen; dies geschah an den Verbindungsstellen von Kolben mit Zu- und Ableitungsrohr mit Hilfe von Klemmschrauben, die in das Innere des Thermostaten zu verlegen sind. Man würde hierbei nun einen Verlust erleiden, da die Dissoziation des Natriumhydrocarbonats bei Brutschranktemperatur keinen scharfen Endpunkt erreicht. Um zu einem solchen zu gelangen, ließen wir nach beendigter Gärung durch den Tropftrichter einen kleinen Überschuß von 25%iger Chlorbariumlösung einfließen. Es setzte sich dann das doppeltkohlensaure Natrium unter Kohlensäureentwickelung weitgehend zu Bariumcarbonat um, wenigstens so vollständig, daß nunmehr bei Wasserstoffzuleitung sämtliche unter diesen Umständen freiwerdende Kohlensäure in die außenstehenden Barytvorlagen übergetrieben werden kann. Waren bis zu diesem Zeitpunkte alle Verbindungen Glas an Glas hergestellt, so lockerte man jetzt die mit Druckschlauch bewirkten Zusammenhänge, dichtete mit Quetschhähnen und entfernte das Gärkölbchen aus dem Brutschrank. Außerhalb desselben wurde dann eine Reihe neuer Barytvorlagen angeschlossen und die Verbindung mit dem Wasserstoffentwickler wieder hergestellt. Durch den Tropftrichter wurde darauf langsam überschüssige Milchsäurelösung (20%ig) zugefügt. Es entwichen schon in der Kälte und noch mehr bei dem erforderlichen Anwärmen Kohlensäure sowie Alkohol, welcher nicht stört, daneben auch schweflige Säure und aus dem Acetaldehydsulfitkomplex freiwerdender Acetaldehyd. Aus den zuvor (siehe S. 315) dargelegten Gründen mußte der Acetaldehyd fortgeschafft werden. Wir erreichten dies durch Einschaltung eines Gefäßes, das schwefelsaures m-Phenylendiamin, und zwar die 10fache Gewichtsmenge des vorhandenen Aldehydquantums, enthielt. Letzteres ist ja bekannt durch die Analyse des Hauptgäransatzes. Die Phenylendiaminsulfatvorlage wurde zunächst nicht erhitzt. Nach etwa $2^1/_2$ Stunden, wenn die Zersetzung des Bicarbonats längst beendet ist, wurde zur Austreibung des gelöst gebliebenen Kohlendioxyds nunmehr ein rascherer Wasserstoffstrom eingeleitet, und jetzt mußte auch der Behälter mit dem schwefelsauren m-Phenylendiamin erwärmt werden. Um das Übergehen wesentlicher Flüssigkeitsmengen in die Barytvorlage zu verhindern, befand sich zwischen dem Aldehydabsorptionsgefäß und dem ersten Barytwasserbehälter ein kleiner aufrecht stehender Kühler. Ein unmittelbar dahinter angebrachter Dreiwegehahn gestattet die Prüfung auf vollständige CO_2-Austreibung. Sämtliche Barytvorlagen waren 3fach

Digitized by Google

tubulierte Wulfsche Flaschen (hohe, schmale Form), deren jede ein langes Druckausgleichsrohr mit Natronkalkbehälter trug. Die ursprüngliche Füllung der Gefäße mit Barytwasser war erfolgt, nachdem das ganze System durch längeres Einleiten von Wasserstoffgas luftfrei gemacht war. Nach beendeter Destillation schreitet man zur Titration. Die erste Gruppe von Vorlagen hat alle im Brutschrank entwickelte Kohlensäure aufgenommen und ist frei von schwefliger Säure. Die verschwundene Menge Barytwasser, dessen unverbrauchter Anteil durch Titration mit Oxalsäure festgestellt wird, zeigt also das ohne Säurezusatz austreibbare Kohlendioxyd an. Die zweite Reihe von Barytvorlagen enthält einen Niederschlag von Bariumcarbonat und schwefligsaurem Baryt. Auch hier wird unter den üblichen Vorsichtsmaßregeln das noch vorhandene Bariumhydroxyd zurücktitriert. Der ganze Inhalt dieser Vorlagen, mitsamt den Niederschlägen von $BaSO_3$, $BaCO_3$ und $Ba(CO_2)_2$, wurde darauf in ein großes Becherglas übergespült und zunächst in der Kälte, später auf dem Wasserbade, 4—5 Stunden mit überschüssigem Brom behandelt. Hierdurch wird alles Bariumsulfit in Bariumsulfat umgewandelt. Dann wird mit Salzsäure angesäuert, freies Brom durch Erwärmen ausgetrieben und das Bariumsulfat in gewohnter Weise bestimmt. Durch Subtraktion des so festgestellten Schwefligsäureäquivalentes von der verbrauchten Barytwassermenge ergibt sich der Gehalt an gebunden gebliebener Kohlensäure, die zu der frei entwickelten hinzuzufügen ist.

Um nicht zu unbequemen Mengen zu kommen, wird, wie erwähnt, die Kohlensäureanalyse zweckmäßig nur in 50,0 ccm des Ansatzes ausgeführt, die man sofort nach Herstellung des Gärungsgemisches entnimmt und in die durch Wasserstoffzuleitung luftfrei gemachte Apparatur bringt. Die Hauptmenge wird im gleichen Brutschrank belassen; an ihr vergewissert man sich auch über das Ende des Gäraktes durch Prüfung mit Ostscher Lösung. Es werden dann Aldehyd-, Glycerin- und Alkoholbestimmungen in der von uns geübten Form vorgenommen. Der Ausfall der so angestellten Versuche war außerordentlich befriedigend.

Beispiel: 100 g Rohrzucker, entsprechend 105,2 g Monosacchariden, wurden mit 80 g Dinatriumsulfit (100%ig), den Nährsalzen sowie 100 g Hefe auf ein Gesamtvolumen von 1000 ccm gebracht. Die Vergärung geschah im Brutschrank von 32°. Wir fanden 17,55 g Acetaldehyd = 16,66% vom Gewichte der eingemaischten 6-Kohlenstoffzucker, 36,51 g = 34,70% Glycerin, 17,32 g = 16,45% Alkohol und 33,70 g = 32,01% Kohlendioxyd.

Der mit aller Sorgfalt ausgeführte Versuch ergab analytisch 99,82% der angewendeten Hexosenmenge in Form von Spaltungsprodukten. Darin liegt zugleich der Beweis, daß andere Gärungsprodukte in zu berücksichtigendem Umfange nicht auftreten.

Digitized by Google

3. Die sekundäre Bildung von Trimethylenglykol bei der 2. Vergärungsform.

Die Folgerung, daß Trimethylenglykol erst nachträglich aus zuvor entstandenem Glycerin, wahrscheinlich durch Mikroorganismen, hervorgeht, ergibt sich aus dem Umstande, daß in den unmittelbar nach der Ausgärung geprüften Maischen das Dioxypropan nicht auffindbar ist. Zu dieser Feststellung gelangten wir bei alsbaldiger Aufarbeitung größerer Gäransätze. Wir beschreiben einen Versuch, bei dem wir von 1 kg Rohrzucker ausgegangen waren.

Ansatz: 1 kg Rohrzucker wurde mit 400 g Hefe, 10 g schwefelsaurem Ammoniak, 5 g Dinatriumphosphat, Spuren von Magnesiumsulfat, Chlorcalcium und Chlorkalium sowie 440 g Dinatriumsulfit auf ein Gesamtvolumen von 10 l gebracht und im Brutschranke bei 36° vergoren. Die Gärung war nach 4 Tagen beendet.

Zwecks Verarbeitung verfuhren wir im Prinzip genau so wie zur Vorbereitung des Gärgutes für die Glycerinanalyse. Es wurde die ausgegorene Maische, in der wir 11,24% Acetaldehyd und 23,12% Glycerin, bezogen auf die zugrundeliegende Hexosenmenge, in aliquoten Teilen ermittelt hatten, mit heiß gesättigter Chlorbariumlösung ausgefällt. Das Filtrat wurde mit kohlensaurem Baryt unter Einleitung von Wasserdampf bis zum Entweichen des Aldehyds erhitzt, von neuem filtriert und im Faust-Heimschen Verdunstungskasten eingeengt. Die hinterbliebenen Salzmassen wurden mit Weingeist erschöpft und die alkoholischen Auszüge vom Sprit befreit; der Rückstand wurde nochmals mit abs. Alkohol aufgenommen und nach Verjagung des Lösungsmittels sodann im Vakuum destilliert. Bei 20 mm Druck stieg das Thermometer nach Abtreiben der Alkohol- und Wasserreste sofort auf ca. 179°, und zwischen 181° und 185° destillierte Glycerin über, während Trimethylenglykol, dessen Siedepunkt bei einem Druck von 15 mm bei 113—115° liegt, auch nicht spurenweise angetroffen wurde. Durch Rektifikation des Glycerins überzeugten wir uns von seiner Reinheit. Wir haben ca. 200 g Glycerin bei diesem Versuch isoliert.

4. Über die Rolle der Sulfite.

Die Wirkung der Sulfite als Abfangmittel für den Acetaldehyd tritt so klar zutage, daß an dem Mechanismus der Reaktion kein Zweifel obwalten kann. Vor allem ist es sicher, daß die schweflige Säure nicht etwa durch ein Reduktionsvermögen an der Erzeugung des Glycerins Anteil hat. Wir haben früher besondere Beweise für diesen nach unseren Darlegungen selbstverständlich erscheinenden Punkt nicht veröffentlicht, holen dies aber nach, da jüngst K. Schweizer[1]) die Bildung des Glycerins

[1]) Helvet. chim. acta 2, 167. 1919.

Digitized by Google

bei der Sulfitgärung auf eine hydrierende Tätigkeit des Dinatriumsulfits zurückführen will. Die ganze Unmöglichkeit einer solchen Annahme ergibt sich einfach aus der Analyse der SO_2-Menge, die zu Beginn und am Ende der Gärung in den Ansätzen vorhanden ist, sowie des Glycerinquantums, das entsteht. Wir haben schon früher hervorgehoben, daß, abgesehen von dem teilweisen Eintritt der schwefligen Säure in organische Bindung mit dem Acetaldehyd und einer gewissen unspezifischen Oxydation, der wässerige Sulfitlösungen immer anheimfallen, keine SO_2-Verminderung erfolgt. Wir führen folgende Belege an:

a) 100 g Rohrzucker lösten wir samt den Nährsalzen und 80 g sekundärem schwefligsaurem Natrium (berechnet auf 100%iges Salz) unter Beigabe von 50 g Hefe M zu 1000 ccm mit ausgekochtem Wasser, durch das zuvor noch 1 Stunde lang Kohlensäure geschickt worden war. Sofort nach dem Ansetzen wurde noch 30 Minuten CO_2 eingeleitet; darauf wurden zweimal je 100 ccm zur Bestimmung des vorhandenen Sulfats entnommen. Diese Proben wurden in einem Rundkolben im Kohlensäurestrom mit überschüssiger Salzsäure so lange erhitzt, bis keine schweflige Säure mehr entwich, sodann auf 500 ccm aufgefüllt und filtriert. Die in Teilen des Filtrats ausgeführte Bariumsulfatanalyse lieferte für die Gesamtmenge der beiden Proben von je 100 ccm 1,980 bzw. 1,990 g $BaSO_4$, im Mittel 1,985 g. Nach Beendigung des Gäraktes, die in einem aliquoten, von der Hauptmenge zu Anfang abgesonderten Teile festgestellt wurde, erfolgte abermals eine SO_4-Bestimmung, genau wie eben beschrieben. Sie ergab in zwei Kontrollen 2,350 bzw. 2,331 g $BaSO_4$, im Durchschnitt 2,3405 g. Die Zunahme an Bariumsulfat betrug demnach pro 100 ccm 0,355 g; das entspricht einer Oxydation von 0,191 g (oder nur 2,38% der ursprünglichen Menge) Na_2SO_3 in 100 ccm Gärgut. Darinwaren 2,93 g Glycerin gebildet.

Wie man sieht, erfolgt eine Umwandlung von Sulfit zu Sulfat. Berechnet man aber die Menge schwefligsauren Salzes, die verschwunden sein müßte, wenn etwa das Glycerin aus einem Zuckerhalbmolekül auf Kosten des Sulfits entstanden wäre, so findet man, daß 4,01 g Na_2SO_3, also mehr als die 20fache Quantität, erforderlich gewesen wären. Daß jene Oxydation des Sulfits eine völlig unspezifische ist, die nicht das geringste mit dem Auftreten des Glycerins zu tun hat, lehren die Ansätze b und c:

b) Dieser Ansatz glich nach Mengenverhältnissen und Ausführung dem Versuch a. Die Vermehrung des Bariumsulfats belief sich in diesem Falle auf 0,3050 g (entsprechend 0,1646 g oxydiertem Na_2SO_3) pro 100 ccm Gärgut und zeigte ein Zurückgehen des ursprünglichen Gehaltes an Sulfit (8 g in 100 ccm) um 2,06% an.

c) Gleichzeitig mit diesem Gärversuche wurde eine Kontrolle mit gekochter Hefe angestellt, derart daß 50 g abgetötete Zellen unter Auflösung

Digitized by Google

von 80 g Na_2SO_3 in luftfreiem, mit gasförmiger Kohlensäure behandeltem Wasser zu 1000 ccm aufgeschlämmt wurden. Ansatz c wurde ebenso lange wie b im Brutschrank digeriert und wie dieser verarbeitet. Das Bariumsulfat hatte am Schluß um 0,595 g pro 100 ccm (entsprechend 0,3211 g oxyd. Na_2SO_3) zugenommen, was einer Verminderung des anfänglichen Sulfitquantums um 4,01% gleichkommt.

Es ergibt sich, daß in der ohne Zucker mit abgetöteter Hefe angesetzten Probe, also ohne Garleistung, die Oxydation des Sulfits viel größer ist, als in der gärtätigen Mischung. Dieser Umstand ist darauf zurückzuführen, daß nach bekannten Erfahrungen Zucker sowie seine Umsetzungsprodukte Acetaldehyd, Alkohol und Glycerin ausgesprochene Konservierungsmittel für schwefligsaure Salze darstellen, und hinzu kommt noch die Schutzwirkung der Kohlensäureatmosphäre während des Gäraktes.

5. Umsetzung verschiedener Zucker nach der 2. Vergärungsform.

a) Vergärung von d-Mannose. α) 10 g Mannose wurden unter Zusatz von 10 g Na_2SO_3 und den üblichen Nährsalzen mit 10 g Oberhefe auf ein Volumen von 100 ccm gebracht und bei 37° digeriert. Nach 5 Tagen waren 1,467 g Acetaldehyd = 14,67% entstanden.

β) Der früher von uns beschriebene Vorlesungsversuch[1]), durch den man die schnelle Aldehydbildung bei der Vergärung von Glucose oder Rohrzucker in Gegenwart von schwefligsaurem Kalk demonstrieren kann, gelingt auch bei Mannose, und zwar sowohl mit obergäriger als untergäriger Hefe.

b) Vergärung von Maltose. Während wegen der Empfindlichkeit der Maltase gegen Hydroxylionen (vgl. S. 318) die Vergärung des Malzzuckers in Gegenwart des alkalisch reagierenden Na_2SO_3 unterbleibt, kann man die Umsetzung dieses Zuckers in Anwesenheit von $CaSO_3$ leicht erreichen. Bei Ausführung in der angegebenen Versuchsanordnung ist nach 20 Minuten Acetaldehyd zu konstatieren.

c) Vergärung von Raffinose. Vergärt man eine 10proz. Raffinoselösung, die zugleich 80% ihres Gewichts an Dinatriumsulfit enthält, mit obergäriger Hefe, so kann man nach $^1/_4$ Stunde Acetaldehyd auf das deutlichste nachweisen. Das gleiche Ergebnis erhält man bei Verwendung von schwefligsaurem Calcium.

---

[1]) C. Neuberg, Zeitschr. f. Botanik. 1918.

Digitized by Google

6. Zusammenhang der 1. und 3. Vergärungsform nach den zeitlichen Verhältnissen.

Die Umsetzungen nach der 3. Vergärungsform verliefen zumeist schneller als die nach der 2. (vgl. Tabelle IV), weil die

Tabelle IV.

Aus 100 ccm Gärgut, enthaltend 10 g Rohrzucker = 10,5 g Hexosen, waren entstanden:

Nach Stunden	Gesamtalkohol (nach der 1. und 3. Vergärungsform) in g	Glycerin in g	Alkohol (nach der 1. Verg.-Form, ber. aus dem Glycerin) in g
9	2,10	0,55	1,96
12	2,75	0,79	2,55
16	3,06	1,00	2,81
24	3,41	1,20	3,11
36	3,46	1,34	3,13
60	3,63	1,45	3,27

Bildliche Darstellung der Ergebnisse:

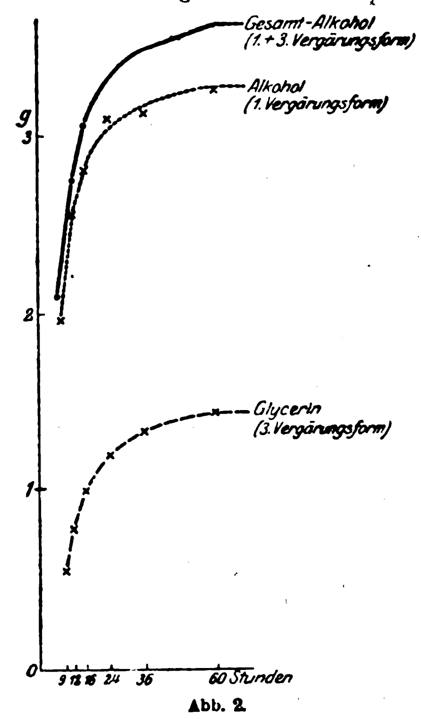


Abb. 2.

Alkalisatoren in der anwendbaren Menge im allgemeinen die biochemischen Prozesse weniger schädigten als schwefligsaure Salze. Deshalb entfiel der Hauptteil des Abbaus schon auf den ersten Tag. Wir gingen wiederum von Invertzucker aus und verfuhren folgendermaßen:

In eine Lösung von 500 g invertiertem Rohrzucker wurden 378 g doppeltkohlensaures Natrium und 350 g obergärige Hefe M eingetragen, wobei das Volumen 5000 ccm betrug. In dieser Konzentration entsprach der Gehalt an $NaHCO_3$ einer 0,9-m-Lösung. Die Vergärung nahmen wir bei 35° vor. Die Bestimmungen von Alkohol und Glycerin geschahen nach 9, 12, 16, 24, 36, 60 Stunden. Nach $1^1/_2$ Tagen waren praktisch schon die Endausbeuten erreicht. Die gefundenen Werte kann man

Digitized by Google

der vorstehenden Übersicht (Tabelle IV) sowie ihrer **kurvenmäßigen Wiedergabe** entnehmen. Der Deutlichkeit wegen heben wir nochmals hervor, daß die Alkoholmenge sich aus den jeweiligen Erträgnissen beider Vergärungsarten zusammensetzt; das auf die gewöhnliche Zuckerspaltung (s. Vergärungsform) entfallende Quantum ist durch die punktierte Linie dargestellt.

7. Die Bilanz der 3. Vergärungsform.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Sulfitgärung erfordert die Bestimmung der Reaktionsprodukte bei Anwendung geeigneter Alkalisatoren keine besonderen Maßnahmen. Die absolute Menge des Acetaldehyds, der nach unseren früheren Feststellungen[1]) zwar zu Beginn der Gärung in vermehrter Menge vorhanden ist, sich zum Schlusse aber nur in Spuren vorfindet, ist zu gering, als daß sie berücksichtigt zu werden braucht. Zu beachten ist nur, daß bei der Extraktion des Glycerins aus den Salzmassen eine gute Durcharbeitung der anorganischen Rückstände erforderlich ist. Die Bestimmung des Kohlendioxyds erfolgte wie bei den Sulfitversuchen in 2 Abschnitten, indem man sie trennt in die Ermittelung der frei entwickelten CO_2 und der erst durch Säuredestillation aus dem alkalischen Gärgut erhältlichen. Alle die Schwierigkeiten, die sich aus der Gegenwart von schwefliger Säure ergeben (s. vorher S. 315), fallen hier fort; nur ist z. B. bei der Anwendung von Natriumhydrocarbonat natürlich die mit diesem Alkalisator eingeführte Kohlensäuremenge zu berücksichtigen. Die Analyse des Kohlendioxyds geschah in allen Fällen durch Absorption in Barytwasser.

Wir haben 5 verschiedene vollständige Bilanzversuche (mit wechselnden Mengen Natriumbicarbonat und Dikaliumphosphat) angestellt, in denen alle Gärungsprodukte der 3. Umsatzform (Alkohol, Kohlensäure, Glycerin, Essigsäure) einzeln ermittelt wurden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle II auf S. 323 angeführt; aus ihnen ist zugleich die Übereinstimmung der analytisch gefundenen Werte mit den theoretischen zu ersehen, die auf Grund der stöchiometrischen Beziehungen der Gärungsprodukte nach den von uns aufgestellten Gärungsgleichungen berechnet worden sind. Hier sei nur noch die Versuchsanordnung beschrieben:

---

[1]) C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. 100, 316. 1919.

Digitized by Google

Bilanzversuch I. Zu einer Lösung von 120 g Rohrzucker wurden 60,6 g Natriumbicarbonat und 120 g Oberhefe M gegeben. Das Volumen wurde auf 1200 ccm gebracht, so daß der Gehalt an $NaHCO_3$ 0,6 m war. Temperatur 34°. Nach 48 Stunden war die Gärung beendet; die Fehlingsche Reaktion im Gärgut fiel negativ aus.

Bilanzversuch II. 200 g Rohrzucker wurden mit 151,4 g $NaHCO_3$ gelöst und mit 200 g obergäriger Hefe Rasse M versetzt. Das Volumen betrug 2 l, die Konzentration des $NaHCO_3$ entsprach der einer 0,9-m-Lösung. Bei 36° war nach 60 Stunden die Maische ausgegoren.

Bilanzversuch III. In eine Lösung von 200 g Rohrzucker wurden 174,3 g Dikaliumphosphat und 200 g Hefe M eingetragen. Das Volumen wurde auf 2000 ccm aufgefüllt; die Konzentration des Alkalisators war = 0,5 m. Nach 48 Stunden war der Zucker praktisch vergoren (Temperatur 36°).

Bilanzversuch IV. Der Ansatz enthielt in 1500 ccm: 150 g Rohrzucker, 150 g Hefe M sowie 196,1 g K_2HPO_4, entsprechend einer 0,75-m-Lösung. Nach 72 Stunden war die Gärung bei 37° abgelaufen, es fand sich noch eine geringe Menge reduzierender Substanz vor.

Bilanzversuch V. Zu 150 g gelöstem Rohrzucker wurden 261,5 g K_2HPO_4 und 150 g Hefe M gefügt; Volumen 1,5 l. Die Konzentration an Dikaliumphosphat betrug 1,0 m. Nach 72 Stunden war die Probe mit Fehlingscher Mischung im Gärgut nur noch schwach positiv, der Zucker also praktisch verbraucht; die Temperatur war 32°.

8. Die sekundäre Bildung von Trimethylenglykol bei der 3. Vergärungsform.

Schließlich teilen wir noch mit, daß bei sofortiger Aufarbeitung auch in den Gärversuchen unter Zusatz von alkalischen Salzen reines Glycerin auftritt und Trimethylenglykol fehlt.

Wir gingen von 1 kg Rohrzucker aus, der, zum Gesamtvolumen von 10 l gelöst, in Gegenwart von 840 g $NaHCO_3$ mit 1000 g Hefe M vergoren wurde. Aus dem filtrierten und eingeengten Gärgut wurde in üblicher Weise das Glycerin mit Weingeist ausgezogen, durch wiederholtes Aufnehmen in Alkohol von Beimengungen befreit und schließlich durch Vakuumdestillation rein dargestellt. Bei einem Drucke von 13 mm erhielten wir nur einen geringen Vorlauf von wässerigem Alkohol, der zwischen 40 und 50° sott, und alles Destillierbare ging zwischen 167° und 168° über, ohne daß beim Siedepunkte des Dioxypropans die geringste Substanzmenge auffindbar gewesen wäre. Die Ausbeute an Glycerin betrug 141,7 g.

Hinsichtlich der Entstehung des Trimethylenglykols liegen also die Verhältnisse bei der biochemischen Spaltung des Zuckers nach der 2. und nach der 3. Vergärungsform gleich.

Digitized by Google

Autorenverzeichnis.

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

STACKS



141706



